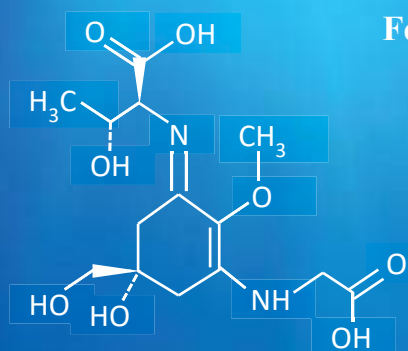


Producción de compuestos bioactivos a partir de biomasa algal basada en la biofiltración y la biorrefinería



Tesis Doctoral
Félix Álvarez Gómez



Universidad de
Málaga

Facultad de Ciencias

Departamento de Ecología y
Geología


2017

Directores:
Félix Diego López Figueroa
Nathalie Korbee Peinado



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Félix José Álvarez Gómez

 <http://orcid.org/0000-0002-4380-1137>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es



**UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA**

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA Y GEOLOGÍA

**PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS A
PARTIR DE BIOMASA ALGAL BASADA EN LA
BIOFILTRACIÓN Y LA BIORREFINERÍA**



Félix Álvarez Gómez

Tesis Doctoral

Noviembre de 2017



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA Y GEOLOGIA

**PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS A PARTIR
DE BIOMASA ALGAL BASADA EN LA BIOFILTRACIÓN Y
LA BIORREFINERÍA**

Memoria presentada por:

Félix Álvarez Gómez

Para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Málaga en el
Programa oficial de Doctorado en

BIOTECNOLOGÍA AVANZADA

Trabajo realizado bajo la dirección de:

Prof. Dr. Félix Diego López Figueroa

Catedrático de Ecología

Universidad de Málaga

Prof. Dra. Nathalie Korbee Peinado

Prof. Titular de Ecología

Universidad de Málaga



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA Y GEOLOGÍA

D. Félix Diego López Figueroa, Catedrático de Ecología del Departamento de Ecología y Geología (Área de Ecología) de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga, y Dña. Nathalie Korbee Peinado, Profesora Titular del Departamento de Ecología y Geología (Área de Ecología) de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga

CERTIFICAN:

Que la presente memoria titulada “*Producción de compuestos bioactivos a partir de biomasa algal basada en la biofiltración y la biorrefinería*” presentada por el Licenciado y Máster Félix Álvarez Gómez, ha sido realizado bajo nuestra dirección y el trabajo presentado y las publicaciones que lo avalan no han sido utilizados en tesis anteriores. Y considerando que representa el trabajo de Tesis Doctoral, autorizamos su exposición y defensa para optar al grado de Doctor en Biotecnología avanzada.

Y para que conste, a los efectos oportunos, firma el presente en Málaga a 30 de Octubre de 2017.

Prof. Dr. Félix Diego López Figueroa

Catedrático de Ecología

Universidad de Málaga

Prof. Dra. Nathalie Korbee Peinado

Profesora Titular de Ecología

Universidad de Málaga



Financiación

Este proyecto de doctorado ha recibido el apoyo financiero de las siguientes instituciones y proyectos:

- Beca de contrato 8.06/5.4282-1 entre la Universidad de Málaga y la Fundación Cueva de Nerja (2016).
- Beca de contrato 8.06/5.44.4775 entre la Universidad de Málaga y Algaetech Innovation S.L. (2017).
- Otros fondos del grupo investigación RNM-295 “Fotobiología y Biotecnología de Organismos acuáticos” (FYBOA).

El presente trabajo se ha llevado a cabo en el Departamento de Ecología y Geología (Área de Ecología) y en los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Málaga.



*“Los científicos dicen que estamos hechos de átomos, pero a mí un pajarito me
contó que estamos hechos de historias”*

- Eduardo Galeno, periodista y escritor uruguayo



Agradecimientos

A mi director de Tesis, el Prof. Dr. Félix López Figueroa, por confiar en mí desde el primer día en que nos conocimos, por guiarme en el maravilloso mundo de la investigación, por su apoyo, sus enseñanzas y sus consejos, por su incansable ayuda y por su eterna disposición. Siempre estaré en deuda contigo por todo lo que has hecho por mí durante estos años.

A mi codirectora, la Prof. Dra. Nathalie Korbee Peinado, por todo el apoyo prestado durante mis primeras andaduras por el laboratorio, por la ayuda con la escritura de los trabajos científicos, por encargarse de toda la burocracia y por su infinita paciencia conmigo a lo largo de toda mi formación.

A Ingrid Palica, por tantísimos buenos momentos vividos en el laboratorio, por todas las risas, todos los té y por tantos otros. Gracias por la infinita amabilidad con la que siempre me has tratado, gracias por brindarme tu casa, tanto en Alhaurín de la Torre como en Alemania. Nunca olvidaré el viaje que hicimos todos juntos a Třeboň y Múnich. Espero que el futuro traiga muchos proyectos en los que seguir trabajando juntos. ¡Muchas gracias de todo corazón!

A mi gran amiga la Prof. Dra. Paula Celis, de la que aprendí tantísimo, quién siempre estuvo ahí para prestarme su ayuda y para solventar mis dudas infinitas, quién me enseñó a manejar todos los instrumentos y todos los equipos de nuestro laboratorio. Por todas las conversaciones científicas que tuvimos mientras nos tomábamos nuestros “tesitos” cargados de antioxidantes. Muchísimas gracias por tanto “Hermana de la ciencia”. Espero que podamos seguir compartiendo conocimientos y coleccionando buenos momentos por siempre.

Al Prof. Dr. Roberto Abdala, por prestarme siempre su ayuda y por todo lo que aprendí sobre líneas celulares, citotoxicidad e inmunología, entre otras muchísimas cosas más.

A la Prof. Dra. Zenilda Bouzon, muchas gracias por enseñarme el mundo de lo minúsculo. Gracias por tantísimas horas de aprendizaje en los microtomos y microscopios del SCAI.

A todo el Departamento de Ecología y Geología, a las “Ecogirl” que ya no están y de las cuales aprendí muchísimo: Miriam, Candela, Raquel, Charo, Conchi y Celia. Muchas gracias por vuestra amabilidad y disposición durante mis primeros pasos en el departamento.

A Gala González, por todo el tiempo que compartimos juntos en el laboratorio, por la ayuda que me prestaste en la realización de mis innumerables experimentos, por la estancia que vivimos en Gran Canaria. Porque eres la investigadora más célebre que conozco y porque sé que llegarás en la ciencia tan lejos como te propongas.

A Virginia Casas, por demostrarme que todo es posible, por ser una Súper Mamá y por ser la prueba viviente de que las 24 horas del día pueden dar para muchísimo. Gracias por toda la ayuda que me prestaste. Te deseo mucho éxito en lo que te queda de doctorado.

A mis amigos de Málaga: Lorena, Antonio Gálvez, Aaron López, Jairo López, Johannes, Juanma, Miguel Zamora, Juan Carlos Yudes, Jesús Serrano, el gran Pablo Ghaly, Carlos Alba, las hermanas Olivia y Elisa Asensi y por último y en especial, a mi hermano de otra madre Marcos Ghaly. Muchas gracias a todos por estos años de amistad que en mi corazón, grabados a fuego, quedarán por siempre.

A mis amigos de toda la vida: Guti, Peja, Coletas, Barto, Carlos Mejias, Cateto, David Montes, Felpi, Genares, Mosca, Jesús Pipo, , Rafa Estrada, Joaquí, Paico, Pedrito Trocoli, Peti, Luisito, Pastel, Andresito, Rati, Rafa Gil, Francisco Comino y Paco Torres. ¡Muchas gracias por todo!.

A todos mis amigos de la carrera, en especial a Víctor Gutiérrez, los primos Ángel y Tomás Herrador, Silvia Martínez, Almudena Rodríguez, Loles Gallego, Ángel Abad, Amparo Herrera, Sandra Domínguez, José Ángel Salatti, Isabel Tenor y Javi Herreros. Porque junto a ellos empecé a dar mis primeros pasitos en el mundo de la ciencia.

A mi querido Demetrio, muchas gracias por todas las mañanas y tardes que me dedicaste en tu casa elaborando los planos que tan chulos quedaron.

A mi primo José Álvarez, por ayudarme a resolver todas las dudas matemáticas que surgieron durante la etapa experimental y durante el desarrollo de la tesis.

Al Prof. Dr. Juan Luis Gómez Pinchetti, muchas gracias por acogerme en el Banco Español de Algas. Fue un tiempo entrañable y que a menudo recuerdo. Muchas gracias por brindarme todo el apoyo y todo lo que necesité para el desarrollo del experimento durante la estancia en Gran Canaria.

Al Prof. Dr. Ignacio Hernández Carrero, muchas gracias por guiarnos en la recolección de *Gracilariopsis longissima* por los esteros de Cádiz y muchas gracias por todas las ocasiones en las que nos enviaste biomasa para realizar los experimentos que en esta Tesis Doctoral quedan plasmados.

Al Prof. Dr. José Bonomi, por todos los momentos vividos tanto en FYBOA como en el GAP2017. Muchas gracias por corregir la tesis con tanta pasión y cariño. Tu esfuerzo y consejos me han ayudado profundamente a la mejora de esta obra.

A todo el Banco Español de Algas, en especial a Mireia, Yolanda, Tamara y Emilio. Muchas gracias por acogerme tan cariñosamente durante mi estancia en la isla.

A mis hermanos latinoamericanos: Daniela, Fredy, Fabián, Agustín y Carolina. Por todos los buenos ratos que pasamos en FYBOA, gracias por enseñarme tanto de vuestra cultura.

A Soledad Rot, porque tus ánimos y tú energía me sirvieron como impulso para la última etapa de esta aventura. Muchas gracias por todo el apoyo que me has dado durante este último año, por celebrar conmigo las alegrías y por apoyarme en los momentos más difíciles.

A mi hermana Lola, porque de ella aprendí a no rendirme nunca y a mantenerme firme en mis objetivos. Gracias por cuidar siempre de mí y brindarme tus mejores consejos.

A mi padre, mi ejemplo a seguir en la vida, porque de él heredé la pasión por la ciencia, porque fue el primero en responder todas mis inquietudes desde niño, porque es quién más orgulloso se siente de este logro que es tanto suyo como mío. Muchas gracias Papá, porque tus consejos me ayudaron a tomar las decisiones correctas. Porque tu esfuerzo ha hecho que nunca me falta de nada.

A mi madre, por todo el cariño que me has dado, porque todo lo que he conseguido no hubiera sido posible sin ti. Gracias por ayudarme, escucharme, animarme y empujarme a esta meta que hoy alcanzamos juntos. Muchas gracias a la única persona del mundo que siempre estará conmigo en las buenas y en las malas, mi Mamá.



Resumen

La presente Tesis Doctoral estudia la acumulación y producción de compuestos bioactivos con interés biotecnológico en macroalgas cultivables o que potencialmente puedan ser cultivadas en condiciones de alto nitrógeno inorgánico (amonio; N-NH_4^+), simulando las condiciones de ef luentes de piscifactorías. Además, las macroalgas fueron cultivadas bajo radiación solar o artificial (radiación activa fotosintética (PAR, $\lambda=400\text{-}700\text{nm}$), complementada con radiación ultravioleta (UVR, $\lambda=280\text{-}400\text{ nm}$), con el fin de valorar la fotoestimulación de compuestos bioactivos y la productividad de la biomasa en el contexto del concepto de la Biorrefinería.

En el **Capítulo 1**, se realizó un estudio de ficoprospección, con la finalidad de seleccionar las especies cultivables o con potencialidad de ser cultivadas de manera intensiva en sistemas de Acuicultura Multitrófica Integrada (IMTA), para ser empleadas en la extracción de compuestos bioactivos con aplicaciones nutracosméticas o cosmeceúticas. Para ello, se recolectaron diferentes macroalgas en distintas zonas del Sur de España que presentan alta irradiancia solar (Gran Canaria, Málaga y Cádiz). Las especies seleccionadas fueron las macroalgas rojas *Gelidium corneum* (Hudson) J.V. Lamouroux, *Gelidium pusillum* (Stackhouse) Le Jolis, *Porphyra umbilicalis* Kützting, *Halopithys incurva* (Hudson) Batters, *Gracilariopsis longissima* (S.G.Gmelin) M.Steentoft, L.M.Irvine & W.F.Farnham e *Hydropuntia cornea* (J.Agardh) M.J.Wynne y la macroalga verde *Ulva rotundata* Bliding. Como control positivo de compuestos bioactivos, aunque no sea una especie cultivable, se empleó el liquen marino *Lichina pygmaea*. Se prepararon extractos algales con diferentes solventes acuosos e hidroalcohólicos que potencialmente pueden contener compuestos bioactivos de interés biotecnológico. Entre los solventes, el mayor rendimiento de extracción se observó en el solvente acuoso (H_2O) y metanólico (MeOH 20%). La mayor actividad antioxidante, expresada en equivalentes de Trolox, se encontró en los extractos de las macroalgas rojas, *H. cornea* seguido de los extractos de *G. longissima*, *H. incurva*, *P. umbilicalis* y *G. pusillum*, mientras que la actividad más baja se detectó en los de la macroalga verde *U. rotundata*. La actividad antioxidante se correlacionó con la concentración de compuestos bioactivos, sin descartar la acción sinérgica entre los compuestos. Se propone preferentemente el uso del método ABTS con respecto al DPPH o BBM, ya que el ABTS valora la capacidad antioxidante tanto de compuestos hidro- como liposolubles.

En el **Capítulo 2**, tres de las especies de algas rojas estudiadas en el Capítulo 1 con mayor capacidad antioxidante, *H. cornea*, *G. longissima* y *H. incurva*, fueron cultivadas durante 14 días en el laboratorio en agua de mar enriquecida con alto contenido de nutrientes (NH_4^+ y PO_4^{3-} , 150 y 15 μM , respectivamente) y con dos niveles de radiación: PAR y PAB (PAR + UVB + UVA). Se estudiaron los efectos del tipo de radiación bajo alta disponibilidad de N- NH_4^+ sobre el crecimiento, pigmentos fotosintéticos (clorofila *a*, carotenoides y ficobiliproteínas), actividad fotosintética y composición bioquímica. La tasa de transporte electrónico máximo (ETR_{max}) aumentó a lo largo del tiempo y los valores fueron más altos en PAR que en PAB en *H. incurva* y en *H. cornea*, mientras que en *G. longissima* ocurrió lo contrario. La eficiencia fotosintética (α_{ETR}) disminuyó con el tiempo en las dos primeras especies, pero en *G. longissima* aumentó, mientras que la irradiancia de saturación (Ek_{ETR}) y el amortiguamiento no fotoquímico máximo (NPQ_{max}) aumentaron, lo que indica una aclimatación fotosintética como la de algas “tipo sol”. En las tres especies, el contenido en N interno y los pigmentos fotosintéticos aumentaron en PAB tras 14 días de cultivo. Se identificaron en todas las especies cinco MAAs mediante Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y Espectrometría de masas por ionización mediante electrospray (ESI-MS): Palythanol, Shinorine, Porphyrin-334, Palythine y Asterin-330. El contenido total de MAAs y la actividad antioxidante aumentaron a lo largo del tiempo en las tres especies, siendo más alto en presencia de UVR. Por lo tanto, se concluye que las tres especies presentaron un mecanismo eficaz de fotoprotección basado en la acumulación de compuestos fotoprotectores con actividad antioxidante, así como en una alta disipación de la energía de excitación (mayor NPQ_{max}).

En el **Capítulo 3** se discuten las implicaciones biotecnológicas de los cambios metabólicos relacionados con la disponibilidad de la radiación y los nutrientes en *Gracilariopsis longissima* en un experimento bifactorial en el laboratorio durante 14 días. Además de las variables fisiológicas y bioquímicas, en este estudio, se analizó la morfología y la ultraestructura a nivel celular mediante microscopía óptica (ML) y de transmisión (TEM). Se observaron tres alteraciones morfológicas principales relacionadas con mecanismos de defensa contra la UVR: un incremento en el espesor de la pared celular, una mayor acumulación de gránulos de almidón y una multiplicación del número de capas de células corticales. Por lo tanto, *G. longissima* mostró una alta aclimatación a UVR y a los nutrientes, sin mostrar disminución en la tasa fotosintética a la vez que aumentó la acumulación de compuestos nitrogenados con rol fotoprotector y con capacidad antioxidante (MAAs). Por otra parte, el almidón, los lípidos y los compuestos fenólicos aumentaron principalmente en presencia de UVR, pero a baja disponibilidad de nutrientes.

En el **Capítulo 4**, se realizó un experimento a mayor escala en las instalaciones acuícolas del Banco Español de Algas (BEA) en el municipio de Telde (Gran Canaria) con *Hydropuntia cornea* en tanques de 90 L y a una densidad algal de 9 g PF L⁻¹. Se estudiaron los efectos interactivos de la

radiación y la disponibilidad de nutrientes con un diseño experimental bifactorial: PAR (cultivo dentro de un invernadero) *versus* PAB (cultivo fuera del invernadero) y emulando condiciones de efluentes de piscifactoría (altos niveles de NH_4^+ y PO_4^{3-}) *versus* baja disponibilidad de nitrógeno (control). Se concluye que la especie *H. cornea* es una excelente candidata para el cultivo en condiciones de alto nitrógeno (aguas ricas en N-NH_4^+ hasta $150 \mu\text{mol NH}_4^+$) en circuito abierto con una capacidad de biofiltración del 98% (NUE) y una tasa de incorporación de N de hasta $75 \text{ mmol NH}_4^+ \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$. Además, *H. cornea* presentó una alta acumulación de compuestos bioactivos de interés tanto nitrogenados (aminoácidos tipo micosporina y proteínas), como carbonados: ácidos grasos poliinsaturados (Omega-3 y Omega-6) y compuestos fenólicos, variando la acumulación en función de las condiciones de cultivo. Por ejemplo, se consiguió una productividad de MAAs de $237 \text{ mg MAAs m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ en el tratamiento con alto N-NH_4^+ en presencia de UVR (fuera del invernadero), siendo hasta el momento el mayor de los valores reportados en la bibliografía. El contenido de ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs) y de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), aumentaron un 77 y 93%, respectivamente en todos los tratamientos de promedio respecto a los contenidos iniciales, reduciéndose así el contenido en ácidos grasos saturados (AGS) en un 55%. Dentro del contenido en PUFAS al final del experimento (35 días), el 72.65% del total correspondió a ácidos grasos del grupo Omega-6, 25.52% del grupo Omega-9 y 1.82% del grupo Omega-3. Esto correspondió, respecto a los valores de la biomasa a los 7 días de cultivo, a una reducción del 87% en Omega-3 y un 19% en Omega-9. En ese tiempo (7 días), la proporción Omega-6/Omega-3 de la biomasa algal fue 3.2-3.4 en algas crecidas dentro del invernadero (sin UVR) mientras que fuera del invernadero (con UVR) fue 1.4-7.3. Los valores recomendados de la proporción Omega-6/Omega-3 en una dieta sana en grasas es de 1-2. Así pues, bajo ciertas condiciones de cultivo, la biomasa de *H. cornea* adquiere buenas características para su uso posterior como alimento funcional, aunque el contenido en lípidos totales no sea tan alto como el de microalgas. Por todo ello, se concluye que las estrategias fotobiológicas junto con la biofiltración de N-NH_4^+ (como simulación de efluentes de peces) y la acumulación selectiva de compuestos bioactivos, muestra que el cultivo de *H. cornea* en tanques, constituye un excelente sistema donde puede ser aplicado el concepto de biorrefinería en el contexto de la Economía azul, esto es, una aproximación a la biotecnología y la prestación de servicios ambientales debido a la depuración de aguas con alto nivel de N-NH_4^+ . Por lo tanto, el cultivo masivo de esta especie supone un reto técnico y comercial para el desarrollo de una producción de biomasa rentable a lo largo del tiempo, dedicada a la producción de compuestos de alto valor añadido (nutracéuticos y cosmeceúticos) y otros productos como bioestimulantes para la agricultura o piensos para alimentación. Todo esto sumado, a los servicios ambientales que presta esta especie en la depuración de aguas.

En el **Capítulo 5** se estudió la citotoxicidad y la capacidad inmunológica de extractos acuosos concentrados por rotavaporación de dos de las algas que presentaron la mejor bioactividad en los extractos en esta Tesis Doctoral, *H. cornea* (Capítulos 1, 2 y 4) y *G. longissima* (Capítulos 1, 2 y 3).

Este estudio fue diseñado para evaluar el uso potencial de los extractos en cosmeceútica y sobre la bioseguridad de los extractos. La citotoxicidad de los extractos fue evaluada mediante el ensayo MTT, el cual se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en tres líneas celulares. Ambos extractos no mostraron actividad citotóxica en células humanas (HaCaT y HGF), aunque sí mostraron citotoxicidad en células murinas tumorales del sistema inmune (macrófagos RAW 264.7), por lo que su uso en productos cosméticos en relación con la salud y seguridad, queda en gran parte garantizado. Por otro lado, se estudió la actividad inmunológica en macrófagos murinos RAW 264.7 a una concentración menor de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ y más baja que el EC_{50} , mediante la producción de compuestos pro-inflamatorios a través de un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) o anti-inflamatorios/proinflamatorios como la interleucina-6 (IL-6). Los extractos de *H. cornea* y *G. longissima* indujeron de forma exponencial la biosíntesis de ambos, de manera que por primera vez estos resultados indican que los extractos de *H. cornea* y *G. longissima* inducen activamente la producción de citoquinas.

Por último, en el **Capítulo 6**, se diseñó un producto cosmético con actividad antioxidante y capacidad fotoprotectora empleando extractos acuosos de *H. cornea* a partir de la biomasa producida en el Banco Español de algas (Capítulo 4) y otros ingredientes usados en cosmética. Es sabido que la exposición excesiva a la UVR puede producir efectos negativos en gran parte mediados por las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas en las vías oxidativas. Una de las formas de reducir el riesgo de la UVR en humanos es el uso de cremas fotoprotectoras con capacidad antioxidante. En capítulos previos (Capítulos 1, 2 y 4), se mostró la alta capacidad antioxidante de los extractos de *H. cornea*. Y en este capítulo se determinó la capacidad fotoprotectora mediante el método Colipa (2011) empleando un simulador solar para cuantificar los siguientes parámetros fotoprotectores: Factor de Protección Solar relacionado con el eritema (FPS) que se trata de una respuesta mediada principalmente por radiación UVB; Factor de Protección de UVA, relacionado con el bronceado persistente expresado como UVA_{FPS} ; y el Factor de Protección frente a efectos biológicos sobre piel, ojos y efectos moleculares en los intervalos espectrales de UVB ($\text{FAPEB}_{\text{UVB}}$) y UVA ($\text{FAPEB}_{\text{UVA}}$). Se emplearon diferentes combinaciones de filtros físicos o inorgánicos (TiO_2 y ZnO), filtros químicos u orgánicos (Tinosorb M y S) y filtros biológicos como extractos de *Hydropuntia cornea* o de *Ginkgo biloba*, aceite de *Pongamia pinnata* (Karanja) y Vitamina C y E. El extracto concentrado de *H. cornea* mostró un efecto sinérgico con el extracto de *G. biloba* y con el aceite de Karanja rindiendo un FPS de 15, una longitud de onda crítica de 386 nm y un UVA_{FPS} de 4.3; lo que se corresponde al de un fotoprotector ideal (valores mínimos recomendados) frente a UVR. En este capítulo, se discute cómo la aplicación de extractos algales en combinación con otros ingredientes naturales, puede ayudar al diseño de una nueva generación de fotoprotectores contra los efectos negativos de la UVR, además de las enormes ventajas relacionadas con su alta fotoestabilidad y termoestabilidad y por no presentar toxicidad ni para

la salud humana ni para el medio ambiente al tratarse de un producto fabricado con componentes naturales y por lo tanto biodegradables.



Abstract

This Doctoral Thesis analyzed the accumulation and production of bioactive compounds in reported cultivable or potentially cultivable macroalgae under high inorganic nitrogen supply (ammonium, N-NH₄⁺), simulating the conditions of fishpond effluents. In addition, macroalgae were cultured under solar radiation or artificial photosynthetic active radiation (PAR; λ =400-700 nm) supplemented by UV radiation (UVR; λ =280-400 nm), in order to evaluate the photoaccumulation of high-valuable biocompounds and biomass productivity in the context of biorefinery concept.

In **Chapter 1**, a screening study was conducted in order to select cultivable species or high potentially cultivable strains in Integrated Multitrophic aquaculture (IMTA) systems to be used for the extraction of bioactive compounds with nutricosmetic or cosmeceutical applications. Several macroalgae were collected in different sites of Southern Spain with high integrated daily irradiances (Gran Canaria, Málaga and Cádiz). The selected species were the red macroalgae, *Gelidium corneum* (Hudson) J.V. Lamouroux, *Gelidium pusillum* (Stackhouse) Le Jolis, *Porphyra umbilicalis* Kützinger, *Halopithys incurva* (Hudson) Batters, *Gracilariopsis longissima* (S.G.Gmelin) M.Steentoft, L.M.Irvine & W.F.Farnham, *Hydropuntia cornea* (J.Agardh) M.J.Wynne and the green macroalgae *Ulva rotundata* Bliding. In addition, as positive control related to bioactive compounds but no with culture potentiality, the lichen *Lichina pygmaea*, was included. Different extracts in water and hidroalcoholic solvents were conducted in order to obtain bioactive compounds with biotechnological interest. Among solvent extractors, the highest yield of extraction was observed using water (H₂O) and water:methanol (MeOH 20%) solvents. The highest antioxidant capacity, expressed as Trolox equivalent, was found in the extracts of red macroalga *H. cornea*, followed by the extracts of *G. longissima*, *H. incurva*, *P. umbilicalis* and *G. pusillum*, whereas the lowest activity was detected in the green macroalga *U. rotundata*. The antioxidant activity was correlated with the quantity of bioactive compounds, without discarding possible synergetic action among the different compounds. The use of ABTS method was considered better compared to DPPH and BMM methods, because this method evaluates the antioxidant capacity of both hydro- and liposoluble compounds.

In **Chapter 2**, three of the studied species in Chapter 1 (*H. cornea*, *G. longissima* and *H. incurva*) were selected due to their higher antioxidant levels and due they are cultivable under high N supply. They were culture in laboratory for 14 d under N-enriched conditions (NH_4^+ y PO_4^{3-} , 150 and 15 μM , respectively) and the effect of two different light treatments: PAR and PAB (PAR + UVB + UVA) was studied on growth, photosynthetic pigment (chlorophyll *a*, carotenoids and phycobiliproteins), photosynthetic activity and biochemical composition. The maximal electron transport rate (ETR_{max}) increased throughout the experimental time being the values in PAB higher than that in PAR in *H. incurva* and in *H. cornea*, whereas in *G. longissima* the result was the reverse. Photosynthetic efficiency (α_{ETR}) decreased throughout the time in the first two above cited species, whereas in *G. longissima* increased. The saturated irradiance (Ek_{ETR}) and maximal non-photochemical quenching (NPQ_{max}) increased in PAB through the time, indicating a photosynthetic acclimation according to a sun-type alga. In the three species, the content of internal N and photosynthetic pigments increased under PAB after 14 d cul ture. Five MAAs were identified by High performance liquid chromatography (HPLC) and Electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS): Palythanol, Shinorine, Porphyrin-334, Palythine and Asterina-330, in the three species. The content of total MAAs and antioxidant activity increased throughout the time, being the highest content in the presence of UVR. Therefore, we concluded that all species showed an efficient photoprotection mechanism against UVR based on the accumulation of UVR-photoprotectors, high antioxidant capacity and high energy dissipation (higher NPQ_{max}).

In the **Chapter 3**, the biotechnological implications of metabolic changes due to radiation (PAR and UVR) and nutrient availability were analyzed in a bifactorial design experiment conducted in the laboratory in *Gracilariopsis longissima* for 14 day s. In addition to physiological and biochemical variables, in this study, morphology and cell ultrastructure were analyzed by using optical (ML) and transmission electron microscopy (TEM). Three main morphological and ultrastructure alterations as defense against UVR were observed: an increase of the cell wall thickness, a high accumulation of starch grains and the increase of cortical cell numbers. Therefore, *G. longissima* showed a high acclimation to UVR under high nutrient supply without decreasing photosynthetic activity, related to the accumulation of N compounds with UV photoprotection capacity and high antioxidant capacity (MAAs). On the other hand, starch, lipids and phenolic compounds increased also under UVR, but under low nutrient supply.

In the **Chapter 4** a scale-up experiment was conducted in *Hydropuntia cornea* grown for 35 d i n experimental tanks of 90 L volume and algal density of 9 g PF L⁻¹. The experiment was conducted in the outdoor culture aquaculture facilities of Spanish Bank of algae (Telde, Gran Canaria). Interactive effects of solar radiation, i.e., PAR (indoor or greenhouse) and PAB (outdoor) and nutrients, i.e., high availability of NH_4^+ and PO_4^{3-} simulating fishpond effluents *versus* low nutrient levels (control) were studied. Data showed that *H. cornea* was an excellent alga for culture in seawater with high nutrient

levels ($150 \mu\text{mol NH}_4^+$) showing NUE of 98% (NUE) and NUR up $75 \text{ mmol NH}_4^+ \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$. Additionally, *H. cornea* showed a high accumulation of bioactive N compounds: MAAs and proteins, but also, C-compounds: poly-unsaturated fatty acids (Omega-3 and Omega-6) and phenolic compounds, changing accumulation in function of culture conditions. For example, we found MAA productivity of $237 \text{ mg MAAs m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ under high NH_4^+ and solar radiation, being the highest MAA productivity reported until now in the bibliography for cultivated macroalgae. The content of monounsaturated fatty acids (MUFAs) and polyunsaturated fatty acids (PUFAs) increased about 80-90% during the culture period. And the ratio Omega-6/Omega-3 of the algal biomass was among 1.4-7.3. Therefore, we conclude that the photobiological strategies together to the biofiltration of ammonium (as simulation of fishpond effluents) and the selective accumulation of biocompounds shown that *H. cornea* tank cultures as an excellent system to apply the biorefinery concept in the frame of Blue Economy, i.e., biotechnology approach and the provision of environmental services due to the depuration of waters with high ammonium levels. The mass cultivation of this species is a technical and commercial challenge to be used as source of nutraceuticals and cosmeceutics in the first extraction and biostimulants for agriculture or animal feed with the rest of biomass, and on the other hand, for environmental application as the depuration of effluents with different origins.

The cytotoxicity and immunological capacities of the water extracts concentrated by rotary evaporation were studied in **Chapter 5** using the two extracts with higher bioactivity as were *H. cornea* (Chapter 1, 2 and 4) and *G. longissima* (Chapters 1, 2 and 3). This study was conducted to evaluate the potential use of these extracts as cosmeceutics and related to the cosmetic biosecurity. The toxicity was evaluated by MTT assay in three cellular lines. Both extracts did not show any cytotoxicity activity against human cells (HaCaT and HGF), however the extracts were toxic against murine macrophages (RAW 264.7). Thus, the extracts can be used in cosmetic with safety for health. On the other hand, the immunology capacity of the water extracts was conducted in murine macrophages (RAW 264.7) at concentration lower than $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ and lower than EC_{50} for toxicity by the production pro-inflammatory compounds in an enzyme-linked immunoabsorption assay (ELISA) as α -tumor necrosis factor (TNF- α) or anti-inflammatory/pro-inflammatory compounds as the interleukin-6 (IL-6). The water extracts of *H. cornea* and *G. longissima* stimulated exponentially the biosynthesis of both TNF- α and IL-6. These results show for the first time that water extracts of *H. cornea* and *G. longissima* induce the production of cytokines of the immunological system.

Finally in **Chapter 6**, a cosmetic product with antioxidant and photoprotection capacities was designed by using water extracts of *H. cornea* from the biomass produced in the Spanish Bank of algae (Chapter 4) and other ingredients used in natural cosmetic. The excessive exposure to UVR can induce negative effects the most of them mediated by radical oxygen substances (ROS) generated in the oxidative pathways. UV photoprotectors with antioxidant capacity in cosmetic products can reduce the risks of UVR in humans. In previous chapters, high antioxidant capacity of *H. cornea* water extracts

was already shown (Chapter 1, 2 and 4). In this chapter, photoprotection capacity was evaluated by using Colipa (2011) assay with a solar simulator: Solar Protection Factor (SPF) related to the erythema, mainly an UVB response; Solar protection factor of UVA related persistent pigment darkening expressed as UVA_{SPF} ; and on the other hand, the photoprotection factor for other biological effects on skin, eyes and molecular reactions in the UVB ($FAPEB_{UVB}$) and UVA ($FAPEB_{UVA}$). Different combinations of physic or inorganic filters (TiO_2 y ZnO), chemical or organic filters of broad band absorption (Tinosorb M y S) and extracts of *H. cornea* or *Ginko biloba*, *Pongamia pinnata* (Karanja) oil and Vitamin C and E were used in the analysed cosmetic product. The concentrated extract of *H. cornea* showed a synergic action together to *G. biloba* extract and Karanja oil, reaching a SPF of 15, critical lambda of 386 nm and UVA_{SPF} of 4.3, corresponding to an ideal UVR photoprotector. In this chapter, it is discussed that the application of the algal extracts in combination with other natural ingredients can help in the desing of a new generation photoprotector filters against the negative effects mediated by UVR. In addition, it is discussed the great advantageous of biological compared to chemical filters related to their high photo- and termostability and the absence of toxicity both against human and enviromental health due to they are biodegradable substances.

Abreviaturas y unidades

% día⁻¹	Tasa de crecimiento
(m/m)	Relación masa/masa
(v/v)	Relación volumen/volumen
μmol m⁻² s⁻¹	Densidad de flujo fotónico (irradiancia)
α_{ETR}	Eficiencia fotosintética
A	Absorptancia
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)
AGL	Ácidos grasos libres
AGS	Ácidos grasos saturados
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de la varianza
APX	Enzima Ascorbato peroxidasa
BBM	Método del β-caroteno
BHT	Antioxidante sintético Butilhidroxitolueno
C	Carbono elemental
C/N	Relación estequiométrica entre Carbono y Nitrógeno
CAT	Enzima Catalasa
CC	Células corticales
CW	Pared celular, del inglés " <i>Cell wall</i> "
Chl_a	Clorofila <i>a</i>
DPPH	2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo
eBP	Productividad de la biomasa estimada (g PS m ⁻² d ⁻¹)
E_{kETR}	Irradiancia de saturación
EtOH	Etanol
ETR_i	Tasa de transporte electrónico integrado respecto al tiempo
ETR	Tasa de transporte electrónico
ETR_r	Tasa de transporte electrónico relativo
FB	Fotosíntesis bruta
FC	Ficocianina
FE	Ficoeritrina
FC/FE	Relación entre Ficocianina y Ficoeritrina
F_v/F_m	Rendimiento cuántico máximo
g.l.	Grados de libertad
GPX	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
H₂O_d	Agua destilada
HaCaT	Línea celular de queratinocitos inmortales humanos
HGF	Línea celular fibroblastos gingivales
IL-6	Interleucina 6
I_m	Irradiancia óptima
M.O. (%)	Porcentaje de materia orgánica
MAAs	Aminoácidos tipo micosporina
mBP	Productividad de la biomasa medida (g PS m ⁻² d ⁻¹)
MeOH	Metanol
ML	Microscopía óptica
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

N	Nitrógeno elemental
N₂	Nitrógeno molecular
NH₄⁺	Catión amonio
NO₃⁻	Anión nitrato
NPQ	Amortiguamiento no fotoquímico
NUE (%)	Eficiencia de incorporación de nitrógeno (%)
NUR	Tasa de incorporación de nitrógeno (mmol m ⁻² d ⁻¹)
°C	Grados centígrados
P	Fósforo
p	Valor de significancia estadística
PAB	Radiación PAR + UVA + UVB (280-700 nm)
PAR	Radiación fotosintéticamente activa (400-700 nm)
PAS	Ácido peryódico de Schiff
PBS	Solución de tampón fosfato PBS (del inglés: <i>Phosphate Buffer Solution</i>)
PF/PS	Relación entre peso fresco y peso seco de la biomasa
PO₄³⁻	Anión fosfato
POX	Enzimas peroxidasas totales
PSII	Fotosistema II (del inglés <i>Photosystem II</i>)
PUFAs	Ácidos grasos poliinsaturados
PV (%)	Peso de la varianza en porcentaje
RAW 264.7	Línea celular de macrófagos murinos
ROS	Especies reactivas de oxígeno
S.D	Desviación estándar (del inglés: <i>Standard deviation</i>)
S.E.	Error estándar (del inglés: <i>Standard error</i>)
S/V	Relación entre la superficie y el volumen
SC	Células subcorticales
SNK	Test estadístico Student Newman-Keuls
SOD	Superóxido dismutasa
TAG	Triacilgliceroles
TB-O	Azul de toluidina
TEAC	Equivalentes de trolox para la capacidad antioxidante
TEM	Microscopia electrónica de transmisión
TiO₂	Dióxido de titanio
TNF-α	Factor de necrosis tumoral
UVA	Radiación Ultravioleta A (315-400 nm)
UVB	Radiación Ultravioleta B (280-315 nm)
UVR	Radiación Ultravioleta (UVB + UVA: 280-400 nm)
VT	Varianza total (100% del Peso de la Varianza)
Y(II)	Rendimiento cuántico de energía fotoquímica convertida en el PSII
Y(NO)	Rendimiento cuántico de pérdida de energía no fotoquímica no regulada en el PSII
Y(NPQ)	Rendimiento cuántico de pérdida de energía no fotoquímica regulada en el PSII
ZnO	Óxido de zinc

Índice

Agradecimientos.....	13
Resumen/Abstract	17
Abreviaturas y unidades	27
Introducción	31
Hipótesis.....	59
Objetivos	61
Material y métodos generales.....	63
Capítulo 1 - Capacidad antioxidante y compuestos bioactivos en extractos macroalgales y líquénicos mediante la aplicación de diferentes solventes y métodos de evaluación	113
1. Resumen	115
2. Material y métodos	116
3. Resultados	121
4. Discusión.....	129
5. Conclusiones	134
Capítulo 2 - Efectos de la radiación UV en la fotosíntesis, la capacidad antioxidante y en la acumulación de compuestos bioactivos en <i>Gracilariopsis longissima</i> , <i>Hydropuntia cornea</i> y <i>Halopithys incurva</i> (Rhodophyta)	135
1. Resumen	137
2. Material y métodos.....	138
3. Resultados	138
4. Discusión.....	150
5. Conclusiones	158
Capítulo 3 - Efectos combinados de la radiación UV y los nutrientes sobre la ultraestructura celular, la fotosíntesis y la composición bioquímica en <i>Gracilariopsis longissima</i> (Gracilariales, Rhodophyta)	161
1. Resumen	163
2. Material y métodos.....	163
3. Resultados	165
4. Discusión.....	176
5. Conclusiones	183

Capítulo 4 – Efectos interactivos de la radiación solar y los nutrientes sobre la biofiltración, fotosíntesis, productividad de biomasa y compuestos bioactivos en <i>Hydropuntia cornea</i> (Rhodophyta)	185
1. Resumen	187
2. Material y métodos	188
3. Resultados	191
4. Discusión	217
5. Conclusiones	230
Capítulo 5 - Ensayos de citotoxicidad e inmunológicos en extractos algales de <i>Hydropuntia cornea</i> y <i>Gracilariopsis longissima</i> (Rhodophyta)	233
1. Resumen	235
2. Material y métodos	236
3. Resultados	236
4. Discusión	240
5. Conclusiones	245
Capítulo 6 - Formulación y elaboración de un producto cosmecéutico con capacidad fotoprotectora y antioxidante a partir del extracto de <i>Hydropuntia cornea</i> y otros componentes	247
1. Resumen	249
2. Material y métodos	250
3. Resultados	253
4. Discusión	263
5. Conclusiones	270
Discusión general	273
Conclusiones finales	295
Material suplementario	299
Referencias	331
Lista de publicaciones	375

Introducción

1. Antecedentes

Debido a la inmensa diversidad y complejidad taxonómica, genética y química de las algas, estos organismos se consideran una fuente inexplorada de productos valiosos por lo que actualmente, son objeto de investigación a muchos niveles (Young et al. 2015). Los esfuerzos de investigación son, en gran parte, impulsados por la apreciación de que muchas culturas han utilizado tradicionalmente los recursos naturales marinos como alimentos y medicinas, y el hecho de que el 70% de la superficie terrestre está cubierta por los océanos, lo que puede proporcionar oportunidades adicionales donde los recursos terrestres son limitados (Stengel & Connan 2015). Más recientemente, ha surgido una búsqueda globalmente creciente para satisfacer las demandas de biomasa con la finalidad de abordar los muchos desafíos de una población humana en expansión, incluyendo el cambio climático, el envejecimiento de la población y la seguridad alimentaria, lo que da lugar a la necesidad urgente de producción sostenible de biomasa de fuentes no tradicionales como vienen siendo las fuentes vegetales. En consecuencia, ha habido un aumento de la inversión a nivel mundial en la biotecnología marina, con la investigación dirigida principalmente a las algas. Estas se caracterizan, respecto a otros organismos, por su alta productividad, muy alta diversidad de especies y de compuestos bioactivos (Blunt et al. 2017). La productividad de biomasa y compuestos de alto valor añadido pasa por el desarrollo de tecnología de cultivos y cosechados para maximizar la producción y optimizar la relación coste/beneficio.

La biomasa obtenida a partir de algas es reconocida mundialmente como una fuente de valiosos componentes químicos con aplicaciones en el sector agroalimentario (incluidos alimentación humana, piensos para alimentación animal y bioestimulantes para plantas), en el sector energético (biodiesel, bioetanol, biogás, biohidrógeno, etc.) así como en el sector nutracéutico y cosmeceútico (Eppink et al. 2017). Sin embargo, el suministro de biomasa algal de calidad y en cantidad suficiente, sigue siendo motivo de preocupación ante las crecientes presiones ambientales que se oponen a la creciente demanda (Jung et al. 2013). Los intentos recientes de suministrar una biomasa consistente, segura y ambientalmente aceptable mediante el cultivo, se han concentrado en caracterizar la variabilidad natural de los compuestos bioactivos y en optimizar los sistemas de cultivo (Barry et al. 2017). Además, las herramientas biotecnológicas como la metabolómica, la transcriptómica y la genómica se han extendido recientemente a la ficología, pero en comparación con las técnicas que ya se aplican para la

obtención de biomasa microbiana o vegetal, estas siguen estando a día de hoy subdesarrolladas (Stengel & Connan 2015). Así pues, en la actualidad, la biotecnología de algas es encaminada, en líneas generales, a la obtención de alimentos, productos cosmeceúticos y energías renovables.

Alimentación: tradicionalmente, las algas se han empleado como alimento humano (Wells et al. 2016). Entre las especies más consumidas se encuentran los géneros *Pyropia/Porphyra*, *Laminaria*, *Saccharina* y *Undaria*. Estas han sido consumidas en el Lejano Oriente, pero también hay pruebas de que las cianobacterias de los géneros *Nostoc*, *Arthrospira* / *Spirulina* y *Aphanizomenon* han servido de alimento humano desde hace milenios en China (Singh et al. 2005; Chisti 2006; Spolaore et al. 2006), Chad y México (Chisti 2006). En Occidente, el consumo de algas se ha restringido predominantemente a las algas rojas especialmente *Palmaria palmata* (Dulse), *Chondrus crispus* y *Mastocarpus stellatus* fundamentalmente en Irlanda, Escocia, Gran Bretaña, Chile y Norteamérica. Mientras que la composición química puede variar según la especie y las condiciones de crecimiento (Colla et al. 2004), tanto las macro como las microalgas contienen altos niveles de componentes nutricionales como son las proteínas (Becker 2007), carbohidratos o fibras vegetales, vitaminas (Fábregas & Herrero 1990) y minerales (Sousa et al. 2008). La búsqueda de nuevas fuentes de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAS, del inglés *Polyunsaturated fatty acids*) ha conducido a un examen intensivo de la composición natural de ácidos grasos de las macroalgas y las microalgas. Por ejemplo, estudios detallados de especies de macroalgas demostraron que la mayoría de estas especies, aunque tienen niveles bajos de lípidos y ácidos grasos respecto a microalgas, son ricas en PUFAs y tienen una buena relación Omega-6/Omega-3 la cual es la más adecuada para los humanos (aproximadamente de 1-2:1) (Simopoulos 2002, Stengel y Connan 2015). Sin embargo, la composición de ácidos grasos y sus proporciones varían entre los diferentes phylum y especies (Schmid & Stengel 2015).

Aplicaciones biomédicas: gran parte de la investigación biotecnológica de algas se centra en la búsqueda de nuevos compuestos para el bienestar humano basados en actividades de promoción de la salud de extractos de algas. La química de los productos naturales es uno de los campos de más rápido desarrollo en biotecnología, y el descubrimiento de nuevos compuestos de microalgas y macroalgas es comúnmente apoyado por métodos analíticos incluyendo Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y Espectrometría de Masas (ESI-MS). Muchas revisiones recientes han puesto de manifiesto la riqueza de compuestos que tienen aplicaciones potenciales para la salud (Jahan et al. 2017), o a su vez esbozaron los muchos productos químicos que tienen aplicaciones tanto para la alimentación como para la salud, tales como aquellos compuestos con altas actividades antioxidantes (Wells et al. 2016). Los nuevos bioensayos y las técnicas de detección y cuantificación aplicadas a las algas están redundando en una amplia producción científica (Plaza et al. 2010; Brodie et al. 2017). La ficoprospección se extiende a través de todos los grupos de algas (Ördög et al. 2004; Zubia et al. 2008; Rastogi & Sinha 2009) y las áreas de aplicaciones biomédicas incluyen la búsqueda de antioxidantes,

anticancerígenos, antimicrobianos, antivirales, compuestos para combatir la obesidad, etc. (Suleria et al. 2016). Los compuestos de interés incluyen los polisacáridos, especialmente polisacáridos ácidos y fucanos, entre otros (Abdala-Díaz et al. 2010; Deniaud-Bouët et al. 2017), los compuestos fenólicos (Freile-Pelegrin & Robledo 2014; Celis-Plá et al. 2016), los diferentes pigmentos (Pangestuti & Kim 2015), los péptidos y proteínas (Harnedy & FitzGerald 2011), los lípidos y ácidos grasos (Ashokkumar et al. 2017) así como compuestos halogenados (Fernando et al. 2016).

Cosmecéutica: Una gran cantidad de productos para el cuidado del cuerpo incluyen ficocoloides (carragenatos y alginatos, especialmente) que aportan propiedades gelificantes y emulsionantes. Además de estas propiedades, se investigan otras dos: (1) capacidad fotoprotectora con el uso de sustancias fotoprotectoras de UVR, las cuales presentan propiedades de absorción de esta radiación por parte de compuestos entre los que destacan los compuestos fenólicos, los carotenoides y los aminoácidos tipo micosporina (MAAs) y (2) propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antitumorales de los extractos de algas (Wang et al. 2014; Ariede et al. 2017).

Los estudios recientes han esbozado claramente el potencial de los extractos de algas en aplicaciones cosméticas: las actividades específicas de los extractos son la actividad fotoprotectora, la actividad antioxidante, hidratante y blanqueante, pero también la actividad anticelulítica y adelgazante ha sido atribuida a una gama de componentes de algas que incluyen pigmentos, polisacáridos, terpenoides y compuestos halogenados, MAAs y compuestos fenólicos, así como proteínas y aminoácidos (Bedoux et al. 2014). Se requieren más estudios sobre la bioactividad y la estabilidad de la composición de los compuestos de algas de fuentes conocidas y científicamente probadas (Kim 2015).

Energía: la importancia de las algas ha aumentado con la búsqueda de nuevas fuentes de energía renovables (Menetrez 2012). Incluso en condiciones de crecimiento altamente desfavorables, las algas pueden prosperar y producir subproductos valiosos como lípidos (transesterificables), carbohidratos, proteínas y diversas materias primas que podrían destinarse a la obtención de biocombustibles y otras materias primas (Hughes & Benemann 1997, Chisti 2007). Teóricamente, se ha calculado que es posible obtener un rendimiento de 200 barriles de petróleo (equivalentes) por hectárea de tierra utilizada para el cultivo de microalgas (Hu et al. 2008). Este rendimiento máximo teórico es 100 veces mayor que para la soja, una materia prima comúnmente utilizada para el biodiesel y es mayor que cualquier rendimiento demostrado (por un factor de 10-20), por lo que estas estimaciones teóricas deberían ser una meta para la industria biotecnológica futura (Menetrez 2012).

En la producción sostenible de biocombustibles, las macroalgas como fuente de biomasa para obtención de estos, presentan varias ventajas potenciales en comparación con las plantas terrestres u otras fuentes de biomasa (John & Anisha 2012). Por ejemplo, sólo algunas especies de macroalgas

contienen lignina (Hoek et al. 1995; Wi et al. 2009), lo que hace que la biomasa de estas sea un material relativamente fácil de digerir en digestores microbianos para la producción de otros biocombustibles como el biogás u otros derivados (Vergara-Fernández et al. 2008). Además, después de los procesos de conversión de combustible, la biomasa remanente puede ser utilizada como fertilizante, para calentar o como sustrato para producir otro tipo de biocombustible (Vergara-Fernández et al. 2008; Ge et al. 2011; Maceiras et al. 2011). Recientemente, los compromisos para el uso de combustibles alternativos han devuelto el interés a las macroalgas (Roesijadi et al. 2010; Rothe et al. 2012). A diferencia de las macroalgas que todavía ocupan un pequeño nicho en el sector bioenergético, las microalgas han ganado atención en las últimas décadas como materias primas para la producción de biocombustibles debido a su alto rendimiento de biomasa por hectárea (Suganya et al. 2016). Sin embargo, la implementación a escala real de los sistemas de microalgas para la producción de bioenergía y productos químicos básicos, está actualmente limitada por los costes técnicos asociados con la construcción y mantenimiento de los biorreactores, la contaminación y la energía requerida para la separación de productos de interés (Goh & Lee 2010). Paralelamente, en los últimos años, las macroalgas han sido consideradas como una "tercera o incluso cuarta generación" de materias primas para los biocombustibles (Milledge et al. 2014). En comparación con las microalgas, las macroalgas derivadas para la obtención de biocombustibles muestran un mayor rendimiento potencial en la evaluación del ciclo de vida y son más fáciles de cosechar desde un punto de vista ingenieril (Aitken et al. 2014). Todo esto hace que las macroalgas hayan sido consideradas como una "tercera o incluso cuarta generación" de materias primas para la obtención de biocombustibles (Goh & Lee 2010; Fernand et al. 2017).

2. Los productos naturales frente a los productos sintéticos

Las algas son una fuente constante de nuevos productos que pueden ser destinados para diferentes fines (Kim & Chojnacka 2015). A diferencia de los compuestos químicos obtenidos mediante síntesis química, los compuestos bioquímicos obtenidos de fuentes naturales ofrecen mucha más diversidad y bioactividad (capacidad de interactuar con un receptor) que las sustancias químicas sintéticas o miméticas y además son biodegradables por que no generarían problemas ambientales (Tengdelius et al. 2017). También se puede esperar que los compuestos naturales posean inherentemente propiedades ventajosas como son la solubilidad en agua, la permeabilidad para atravesar las membranas celulares y la biodisponibilidad respecto a los productos químicos sintéticos (Olaizola 2003).

El caso de la astaxantina, es quizás el más notorio en cuanto a comparación de productos sintéticos *versus* compuestos naturales. En la actualidad, los mayores productores de astaxantina la

obtienen mediante síntesis química (alrededor del 95% de la producción mundial) por parte de las compañías BASF y Hoffman-La Roche (Spolaore et al. 2006; Shah et al. 2016). La astaxantina sintética tiene una relación diferente de estereoisómeros que la astaxantina natural que se encuentra en el alga verde *Haematococcus*, por lo que la biodisponibilidad tanto para animales como para humanos, se ve reducida debido a estas sutiles diferencias en cuanto a la estructura molecular. La industria acuícola es el principal sector al que se destina este compuesto para alimentar al salmón fundamentalmente (Eaton et al. 2016; Hikima et al. 2017). Además, las astaxantina sintética ha demostrado poseer una capacidad antioxidante significativamente menor que la astaxantina natural (Capelli et al. 2013). Otros casos notables se han dado con componentes como la vitamina E y el β -caroteno sintético, los cuales presentan una menor absorción por parte del sistema digestivo humano respecto a fuentes naturales así como una menor capacidad antioxidante (Bahner 1993; Castenmiller et al. 1999). El β -caroteno sintético también se ha reportado que es un potencial promotor de la carcinogénesis (Shanab et al. 2012). Lo mismo ocurre con el resto de todo el espectro de vitaminas que se requieren para la homeostasis en el ser humano, las cuales presentan una mayor biodisponibilidad si proceden de fuentes naturales con respecto a fuentes sintéticas (Thiel 2000). Respecto a los compuestos antioxidantes encontrados en algas, algunas moléculas con capacidad antioxidante, presentan actividades relativamente más altas, en comparación con antioxidantes comerciales como el BHA (hidroxibutilanisol) y el BHT (Butilhidroxitolueno) (Abd El-Baky et al. 2010). Por lo tanto, la investigación sobre los productos naturales a partir de las algas se propone actualmente como una alternativa natural a los productos sintéticos (Sabeena Farvin & Jacobsen 2013).

3. Retos en biotecnología algal para la obtención de productos naturales

El desarrollo de nuevos productos a partir de fuentes biológicas incluyendo algas implica muchos pasos que son impulsados por nuevos mercados y demandas de los consumidores, pero requiere una inversión económica significativa (Stengel & Connan 2015). Otro obstáculo es el prolongado proceso de aprobación de las agencias de seguridad pertinentes que garantizan la seguridad de los consumidores y las normas sobre productos y comercio (Roberts & Upham 2012).

El "time-to-market", siendo este un concepto anglosajón que define el tiempo que tarda un producto desde que es concebido hasta que está a la venta, es probablemente más corto para los productos algales destinados a la agricultura que para los productos nutraceuticos y cosmecuticos, siendo extremadamente dilatado para los compuestos algales destinados al ámbito biomédico o farmacéutico (Vigani et al. 2015). Estos compuestos engloban sustancias químicas a partir de fuentes naturales y que, cuyo consumo, resulta especialmente beneficioso tanto en la prevención de

enfermedades como en la mejora de las funciones fisiológicas del organismo a nivel nutricional o en la piel (Leonard 2006).

La biomasa de algas puede derivarse de recursos naturales o cultivados, que pueden o no estar predefinidos mediante la selección y caracterización de especies así como por recolección de especies la cuales pueden variar según su origen (Plaza et al. 2010). El conocimiento de la función biológica del compuesto, y de su rol ecológico, proporcionarían una notable contribución a todo el proceso, pues es probable que arroje una idea de los mecanismos bioquímicos que subyacen al componente y que podrán servir de apoyo para su utilización, por ejemplo, en el desarrollo de fármacos.

Dependiendo del organismo, los enfoques de ingeniería genética o metabólica pueden ser posibles, si se dispone de suficiente información genómica para el organismo, así como la metabolómica y transcriptómica de la biosíntesis del compuesto en cuestión. Cuando el cultivo de los organismos fuente, o los enfoques genéticos no son factibles, la síntesis química puede ser una vía para suministrar cantidades suficientes para ensayos adicionales y el desarrollo eventual del producto. En este momento se necesitarán considerables inversiones financieras y el compromiso a largo plazo de la industria para llevar a cabo ensayos en humanos para el desarrollo posterior de nutracéuticos y cosmeceúticos y, en particular, para el desarrollo de nuevos productos farmacológicos (Stengel et al. 2011).

4. Fuentes de biomasa

Las demandas sobre la biomasa de algas marinas se han multiplicado por una conciencia globalmente creciente, así como por un mayor conjunto de evidencias científicas, de sus beneficios potenciales y las muchas aplicaciones dentro de varios sectores, pero también implican cambios en las fuentes de algas que abastecen a los mercados existentes. Por ejemplo, la biomasa de algas pardas (*Ascophyllum nodosum* y *Fucus* sp. principalmente) cosechadas del medio natural en Europa, principalmente para la producción de alginatos, aumentó de unas 5.000 a 30.500 t entre 1999 y 2009, mientras que la cosecha de *Macrocystis* disminuyó de 35.000 a 5.000 durante el mismo período (Bixler & Porse 2011). La gestión prudente de los recursos es, por tanto, fundamental no sólo para apoyar a las industrias locales y los beneficios socioeconómicos conexos de las comunidades costeras a largo plazo, sino también para evitar la pérdida de hábitat y los daños a los ecosistemas marinos, ya que las macroalgas como productores primarios y proveedores de hábitat son componentes funcionales esenciales de las comunidades costeras (Stagnol et al. 2013). Una consideración adicional, cuando se utilizan los recursos naturales, es la variabilidad potencial en la composición química de las reservas naturales. Esto puede ser ventajoso en algunos casos en los que se pueden seleccionar los sitios y

tiempos de cosecha más adecuados. Sin embargo, la variación natural en la composición y calidad de la biomasa (Craigie et al. 2008) puede no ser apropiada para todas las aplicaciones que pretendan conseguir productos de alto valor añadido (Hafting et al. 2012).

Respecto a la producción de biomasa cultivada para distintos usos, las macroalgas presentan una serie de ventajas y características que las hacen más idóneas que las plantas terrestres: muchas especies crecen más rápido que las plantas terrestres (John et al. 2011; Chen et al. 2015) presentando una mayor producción anual ($t\ PS\ ha^{-1}\ año^{-1}$) para algunas especies algales respecto a las plantas terrestres. Por ejemplo *Gracilaria chilensis* produce $60\ t\ PS\ ha^{-1}\ año^{-1}$ frente a *Zea mays* que produce $20\ t\ PS\ ha^{-1}\ año^{-1}$ (Chung et al. 2011). Además, las algas marinas no ocupan tierras de cultivo y no consumen agua dulce (Fedoroff et al. 2010), por lo que no compiten con los alimentos tradicionales de la agricultura que se destinan a alimentación humana (Goh & Lee 2010; Daroch et al. 2013). Además, las macroalgas, como se indicó más arriba, normalmente contienen menos contenido en lignina, lo cual facilita el tratamiento posterior de dicha biomasa (Burton et al. 2009; Cho et al. 2013). La productividad de la biomasa de algas cultivadas es aproximadamente de $22\ kg\ m^{-2}\ año^{-1}$ siendo mucho mayor si se compara con la producción de las plantas terrestres, con una producción promedio de $0.5-4.4\ kg\ m^{-2}\ año^{-1}$ (Brinkhuis et al. 1987; Lewandowski et al. 2003; Wei et al. 2013).

Aun así, el cultivo de macroalgas a día de hoy representa sólo un pequeño porcentaje respecto a la producción global de biomasa en general: $17 \cdot 10^6$ toneladas de peso fresco en comparación con las $16 \cdot 10^{12}$ toneladas de cultivos terrestres, herbáceas y bosques (Pimentel & Pimentel 2007, Roesijadi et al. 2010; Pimentel 2012). Las evidencias actuales sugieren que las macroalgas pueden ser una fuente alternativa de biomasa para la producción sostenible de alimentos, productos químicos y biocombustibles entre muchos otros productos (Wargacki et al. 2012; Yun et al. 2015). El progreso actual en la biotecnología de algas es impulsado por una mayor demanda de nuevas fuentes de biomasa debido a varios desafíos globales, nuevos descubrimientos y tecnologías disponibles, así como una mayor conciencia global de las muchas aplicaciones de algas (Trivedi et al. 2015). La diversidad y complejidad de las algas ofrecen por tanto, un potencial significativo, siempre que se pueda satisfacer la biomasa adecuada y segura, y las demandas de los consumidores coincidan con la inversión comercial en el desarrollo de productos.

China (49%) e Indonesia (37.2%) son los principales países recolectores/productores de biomasa algal y ostentan juntos el 86% de toda la producción mundial (Buschmann et al. 2017). Las dos especies principales más cultivadas en todo el mundo son las algas tropicales *Kappaphycus alvarezii* y *Eucheuma* sp. (FAO 2016). Indonesia aumentó su producción anual de cultivo en más de 10 veces, pasando de 2.4 millones de toneladas en 2005 a 10 millones de toneladas en 2014, y su política nacional pretende continuar con esta tasa de crecimiento para los próximos años (FAO 2016).

Además de las dos especies citadas, las algas rojas *Gracilaria* / *Gracilariopsis* ocupan el tercer puesto en la lista de especies de algas marinas rojas más cultivadas del mundo, con más de 3.8 millones de toneladas de producción anual y con un valor anual de aproximadamente 1000 millones de dólares (FAO 2016). Los géneros *Gracilaria* y *Gracilariopsis* se han cultivado principalmente en dos países asiáticos, China e Indonesia con un 70 y 28% de la producción mundial respectivamente. En Sudamérica, Chile es el país más productivo, produciendo más de 12.8 toneladas por año con un valor anual de 29 millones de dólares (FAO 2016). La mayor parte de la biomasa se utiliza en la industria de los ficocoloides como fuente principal de agar y carragenanos de calidad alimentaria (Pereira & Yarish 2008) así como alimento para animales (Qi et al. 2010; Johnson et al. 2014). Actualmente se aceptan taxonómicamente 185 especies de *Gracilaria* y 24 de *Gracilariopsis* (Guiry & Guiry 2016). Estos géneros incluyen especies fácilmente cultivables y que presentan altas tasas de crecimiento (Gorman et al. 2017). Además, poseen un alta capacidad de adaptación a diferentes condiciones ambientales: pueden crecer en condiciones de salinidad comprendidas entre 10-40 g L⁻¹ (Weinberger et al. 2008; Kim et al. 2016) y toleran intervalos de temperatura de entre 0 a 35 °C (Yokoya et al. 1999; Raikar et al. 2001; Kim et al. 2016) y que actualmente, se proponen como especies productoras de compuestos bioactivos (Sakthivel et al. 2016; Kang et al. 2017).

5. Ficoprospección

Ya se ha citado la importancia de la Biotecnología algal por tratarse de un campo importante y casi ilimitado de investigación básica y aplicada. Aun así, aunque es cierto que la ficoprospección ha proporcionado algunos nuevos productos naturales marinos para un campo casi ilimitado de usos, se ha estimado que el número de compuestos aislados de fuentes marinas entre 1965 y 2006 (alrededor de 18.500) constituyen sólo alrededor del 3% de los compuestos marinos existentes (Ibañez & Cifuentes 2013). Desde 2006 hasta 2015, este número se ha incrementado en un 29% de acuerdo a la base de datos de productos naturales MarinLit (Young et al. 2015). Por lo tanto, la búsqueda de nuevas especies algales que posean nuevos compuestos biológicamente activos a partir de fuentes marinas puede considerarse un campo de investigación casi ilimitado.

La selección y producción de especies algales para la obtención de biomasa dependen principalmente de las especies cultivadas, el método de cultivo y la demanda de productos en el mercado actual. Además, es necesario que las especies presenten una alta capacidad de biofiltración/asimilación de nutrientes (Chopin et al. 2001) y de la posibilidad de convertir la biomasa en componentes que posean un valor económico en el mercado actual (Figura I.1). Además de la biofiltración de nutrientes inorgánicos disueltos, las algas fijan entre el 50-70% del dióxido de carbono (CO₂) atmosférico (Chung et al. 2011). Por lo tanto, la producción de biomasa algal, además de

proporcionar recursos económicos como los compuestos bioactivos con alto valor añadido, también proporciona beneficios ambientales, ya que servirían para retirar el CO₂ antropogénico ayudando así a mitigar los efectos del cambio climático (Laurens et al. 2017).

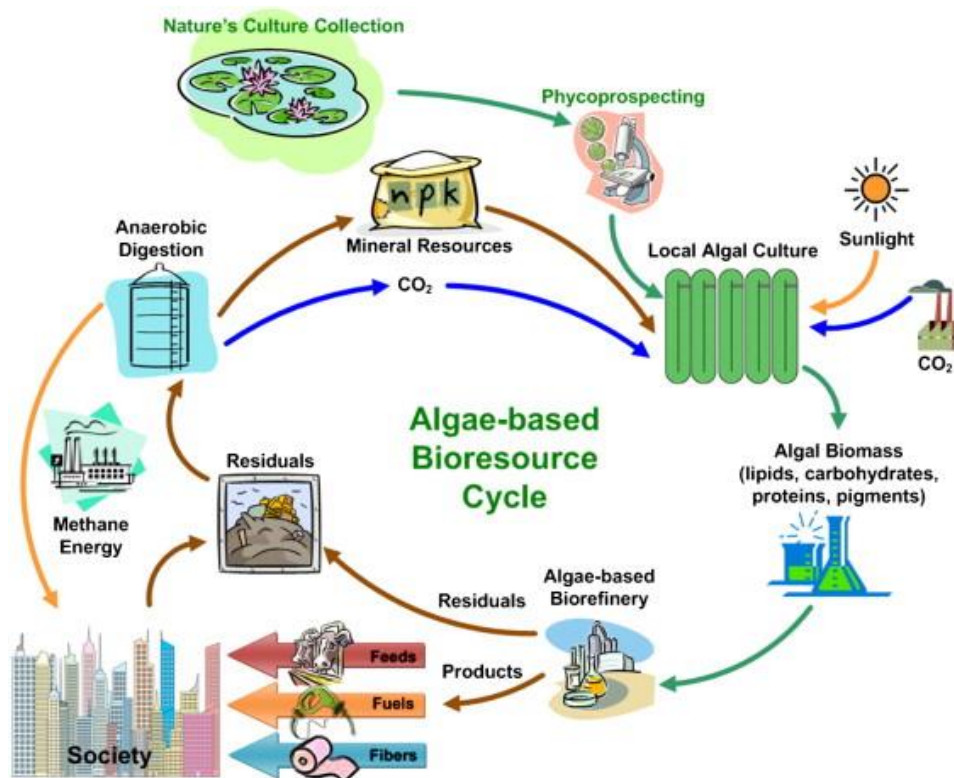


Figura I.1. El ciclo de los biorrecursos algales (Obtenido de Wilkie et al. 2011).

6. Compuestos bioactivos

De todos los productos naturales marinos representados en MarinLit, (base de datos estándar de la industria para este tipo de compuestos) los que suscitan un mayor interés en la comunidad científica son aquellos que derivan de las algas (Young et al. 2015). Además de las algas, los líquenes (organismos simbióticos generalmente entre algas y hongos) también presentan una amplia diversidad de metabolitos secundarios denominados “sustancias liquénicas” (Xu et al. 2016).

Los productos naturales o compuestos bioactivos, presentan intrínsecamente bioactividad al proceder de un organismo vivo (Newman & Cragg 2016). Estos compuestos bioactivos procedentes de las algas, tienen cada vez más un mayor atractivo por parte de la industria biotecnológica pues presentan propiedades beneficiosas para la salud entre otras muchas aplicaciones (Suleria et al. 2016). Los receptores de estas interacciones todavía no se conocen en su totalidad, de hecho, muchos estudios no han podido demostrar, de manera clara y concisa, los roles ecofisiológicos de los metabolitos

secundarios. La mayor evidencia experimental que existe actualmente para los receptores de compuestos bioactivos, deriva de las aplicaciones biomédicas (Harel et al. 2013; Luckner 2013).

Los metabolitos secundarios se clasifican de acuerdo con la ruta biosintética de la que procedan (Figura I.2) (Cardozo et al. 2007). Estudios metabolómicos y genómicos en organismos fotosintéticos, han revelado que existe un número limitado de rutas biosintéticas y que estas son las responsables de la producción de la mayoría de los compuestos bioactivos. Mientras que las rutas biosintéticas comunes pueden proporcionar el marco para las distintas clases de metabolitos secundarios, su funcionalidad es impartida por enzimas de adaptación especializadas que son a menudo únicas para cada producto natural (Walsh 2004; Hertweck et al. 2007). Si se trata de la adición enzimática de grupos alcohol, halogenación, oxidación, reducción, manipulación estereoquímica, o ciclación, son a menudo estas funcionalidades que hacen que los metabolitos secundarios sean únicos y bioactivos (Gribble 1998).

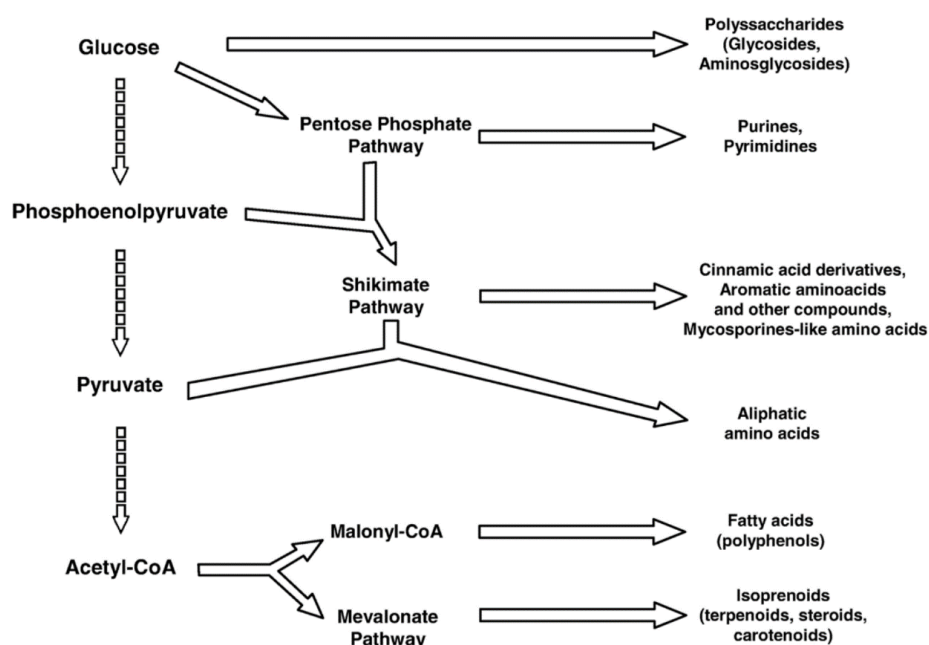


Figura I.2. Principales vías biosintéticas de metabolitos primarios y secundarios (Obtenido de Cardozo et al. 2007)

El 90% de moléculas de las algas, presentan algún halógeno en su estructura lo cual aumenta su capacidad bioactiva (Paul & Pohnert 2011). Estos compuestos pueden poseer incluso 6 átomos de un único elemento químico halogenado o incluso diferentes halógenos (bromo, cloro, yodo) en una misma molécula. Estos metabolitos son biosintetizados en las algas en respuesta a innumerables condiciones ambientales con la finalidad de aumentar la capacidad de aclimatación al medio (Cabrita et al. 2010).

Dentro de la gran heterogeneidad de algas marinas, las algas rojas, son el grupo de algas con mayor biodiversidad específica y mayor diversidad de compuestos químicos, cerca de 1700 compuestos descritos hasta hace un año (Blunt et al. 2016). La mayoría de los compuestos químicos de las rodófitas (57%) se encuentran en la familia Rhodomelaceae con aproximadamente el 85% procedente del género *Laurencia* (Maschek & Baker 2008). Por otro, las algas pardas producen florotaninos de naturaleza polifenólica existiendo actualmente más de 1.200 compuestos químicos de los cuales más de un tercio pertenecen al género *Dictyota*. La división clorofita es quizás la que tiene menos metabolitos secundarios analizados entre las macroalgas (270 compuestos aprox.). Las algas verdes presentan compuestos químicos similares a los de las algas rojas, pero carecen del mismo grado de halogenación. Alrededor de la mitad de todos los compuestos bioactivos procedentes de algas verdes provienen del orden Bryopsidales, con más del 85% de composición en terpenos (Scheuer 2013). Entre 2011 y 2013, había sólo unos pocos artículos de nuevos compuestos a partir de algas verdes, todos los cuales carecen de una diversidad estructural de metabolitos conocidos (Blunt et al. 2016). Sin embargo, los líquenes presentan una mayor cantidad de compuestos bioactivos que cuando sus simbioses se encuentran viviendo de forma independiente (Le Pogam et al. 2015).

6.1. Compuestos nitrogenados

6.1.2. Proteínas

Generalmente, el contenido proteico de las macroalgas es bajo comparándolo con microalgas (Becker 2007). Además, este contenido puede variar en función de las especies así como de las condiciones estacionales. En general, las algas pardas han mostrado menos contenido proteico con respecto a las algas verdes y rojas. De acuerdo a literatura científica, las algas rojas poseen un porcentaje alrededor de un 18.3%, las algas verdes un 15.1% y las algas pardas alrededor de un 5.9% (Lourenço et al. 2002; Patarra et al. 2011; Biancarosa et al. 2016). Burtin (2003) ha demostrado que algunas algas rojas, como *Palmaria palmata* y *Porphyra tenera*, poseen un alto contenido de proteínas hasta 35 y 47% del peso seco, respectivamente. En cuanto a la composición de aminoácidos, las algas presentan 17 de los 21 aminoácidos existentes en la naturaleza lo cual hace de estas una importante fuente de proteínas con alto valor biológico para ser empleadas en alimentación (Qasim 1991).

Por este motivo, la calidad nutricional de las proteínas algales se determina por el contenido de aminoácidos, la proporción y la biodisponibilidad de estos (Becker 2007). Las algas presentan una cantidad notable del aminoácido lisina, que habitualmente es deficiente en plantas terrestres (Tabakaeva & Tabakaev 2016). Otros estudios indicaron que tanto el ácido aspártico como el ácido glutámico, constituyen una gran fracción de aminoácidos de las algas, en comparación con alimentos como la soja y los huevos (Fleurence 1999, 2004). El ácido glutámico en su forma ionizada, el

glutamato, es el mayor responsable del nuevo sabor denominado “umami” que completa los cinco sabores básicos reconocidos (Zhang et al. 2017).

Actualmente, las investigaciones más específicas en cuanto a las proteínas extraídas de algas, se centran en el estudio de los péptidos, ya que se ha demostrado que estos poseen una bioactividad similar a la que podrían tener ciertos fármacos (Jo et al. 2017). Algunas especies de algas han inducido actividades biológicas, que están asociadas con proteínas, hidrolizados de proteínas o péptidos y que pueden afectar su posición más allá de sus valores nutricionales como antioxidantes, antihipertensivos (Fitzgerald & Murray 2006), inmunomoduladores (Morris et al. 2007), anticancerígenos (Sheih et al. 2010), hepatoprotectores (Hwang et al. 2008) y anticoagulantes (Athukorala & Jeon 2005). Estas bioactividades serían una ventaja añadida para acceder a sus aplicaciones multifuncionales, incluyendo alimentos funcionales o nutracéuticos (Mohamed et al. 2012), los productos farmacéuticos (Agyei & Danquah 2011) y los cosmeceúticos (Stolz & Obermayer 2005; Sekar & Chandramohan 2008). Por lo tanto, las proteínas y péptidos a partir de algas, podrían servir para satisfacer las necesidades futuras de estos nutrientes para consumo humano (Kovač et al. 2013).

6.1.3. Ficobiliproteínas

Las ficobiliproteínas o ficobilinas, son otro grupo de compuestos nitrogenados cuya función principal es actuar como pigmentos accesorios en el proceso fotosintético. Son una familia de proteínas fluorescentes que se encuentran en algunos grupos taxonómicos de algas (cianobacterias, rodófitas, criptofitas y glaucófitas) (Sekar & Chandramohan 2008, Hemlata & Fareha 2011). Las ficobiliproteínas son un grupo de pigmentos accesorios (ficoeritrina, ficocianina y aloficocianina) organizados en los ficobilisomas y conectados al Fotosistema II (PSII). Absorben radiación lumínica en la región que va desde 470 a 660 nm, y transfieren eficientemente la energía a la clorofila *a* (Viskari et al. 2001; Viskari & Colyer 2003; Borowitzka 2013). Entre las diferentes ficobiliproteínas, la ficocianina es una de las moléculas con mayor importancia actualmente debido a sus diversas propiedades biológicas y farmacológicas (Romay et al. 1998; McCarty 2007). Una de las propiedades químicas que hacen que esta sea de interés en la industria biotecnológica, es la estabilidad fisicoquímica que presenta (Eriksen 2008; Chaiklahan et al. 2012). Se le atribuyen numerosas aplicaciones en el ámbito biomédico, tales como capacidad neuroprotectora (Pentón-Rol et al. 2011a), capacidad antiinflamatoria (Romay et al. 1998 2003; Cherng et al. 2007), anticancerígena (Wang et al. 2000), antioxidante (Romay et al. 2003; Benedetti et al. 2004; Guan et al. 2009), hipolipidémico (Alhazza et al. 2011), antitumoral (Li et al. 2005; Gardeva et al. 2014), inmunomoduladora (Chen et al. 2014), ateroprotectora (Strasky et al. 2013), hepatoprotectiva (Vadiraja et al. 1998), antipérgica (Shih et al. 2009), antiviral y antimicrobiana (Pentón-Rol et al. 2011b; Najdenski et al. 2013). Otra ficobiliproteína de importancia actual, es la ficoeritrina, la cual es empleada en la industria biomédica como marcador fluorescente y

que recientemente ha despertado un interés para su uso como colorante natural (Stengel & Connan, 2011).

6.1.4. Aminoácidos tipo micosporina

Los aminoácidos tipo micosporina (MAAs) son metabolitos secundarios sintetizados por organismos que viven en ambientes con altas irradiancias. Se caracterizan por un anillo de ciclohexenona y ciclohexenimina que deriva del ácido shikímico. Se han identificado más de 35 tipos diferentes de MAAs (Korbee et al. 2006; La Barre et al. 2014; Becker et al. 2016; Oda et al. 2017) y son ampliamente conocidos por su rol fotoprotector frente a la UVR. Estos compuestos aminoacídicos son eficientes en la absorción de la radiación UV (310-360 nm), y son un atractivo cada vez más creciente para la industria cosmética por la actividad biológica que presentan (Lawrence et al. 2017). Los MAAs tienen conjugado en el anillo, sustituyentes nitrogenados (amino), aminoácidos o sus aminoalcoholes correspondientes. La glicina es el aminoácido más común presente en los MAAs (Carreto & Carignan 2011). Las diferencias en los espectros de absorción de MAAs se deben a variaciones en los grupos laterales unidos y en el sustituyente de nitrógeno (Whitehead & Hedges 2005). Los MAAs han sido explotados comercialmente para proteger la piel y otros materiales no biológicos, por ejemplo, aditivos fotostabilizantes en plásticos, pinturas, tejidos y barnices (Bandaranayake 1998; Fernandes et al. 2015).

Las principales bioactividades y funcionalidades de los MAAs actualmente se encuentran en expansión (Sinha 2013). Su rol más conocido es el de fotoprotectores para UVA y UVB (Carreto & Carignan 2011) así como compuestos con propiedades antioxidantes (Dunlap & Yamamoto 1995; De La Coba et al. 2009, Lawrence et al. 2017). Sin embargo, también desempeñan un papel en la reducción de la formación de dímeros de timina en células dérmicas expuestas a UV (Misonou et al. 2003) y presentan actividad inmunomoduladora sobre la dermis (Becker et al. 2016). El aminoácido Pophyra-334 suprime la producción de radicales libres de oxígeno (ROS) y la expresión de metaloproteinasas (MMPs) tras exposición de fibroblastos a la radiación UVA mientras que componentes de la matriz extracelular aumentan (procolágeno, colágeno tipo I y elastina) (Ryu et al. 2014). También ejercen beneficios sobre la dermis actuando como inhibidores de la collagenasa (Hartmann et al. 2015) modulando la proliferación de queratinocitos por activación de quinasas (Choi et al. 2015) e interviniendo en procesos antiinflamatorios entre otros (Suh et al. 2014a; Becker et al. 2016).

6.2. Compuestos carbonados

6.2.1. Lípidos

Las algas presentan en su composición ácidos grasos con alto grado de insaturaciones y con múltiples beneficios sobre la salud humana (Zhukova & Aizdaicher 1995, Puri 2017). Una ingesta de

ácidos grasos poliinsaturados n-3 de cadena larga (PUFAs), como el ácido docosahexaenoico (DHA, C 22: 6 n-3) y el ácido eicosapentaenoico (EPA, C 20: 5 n-3) dentro de una dieta, han demostrado tener efectos beneficiosos en los seres humanos, en enfermedades cardiovasculares e inflamatorias (Simopoulus & DiNicolantonio, 2016; Richardson et al. 2017). Estos efectos beneficiosos parecen ser debidos a los efectos combinados en otros parámetros diversos, como la reducción de los triacilgliceroles séricos y a la inhibición de la agregación plaquetaria (Harris et al. 1997), así como un efecto directo (antiarrítmico) en el corazón (Leaf & Kang 1996). Los resultados de los ensayos clínicos pueden sumarse a los de varios estudios epidemiológicos en poblaciones cuyo consumo habitual de PUFAs se asocia con una menor incidencia de enfermedad coronaria (Albert et al. 1998; Guallar et al. 1999). En la actualidad una importante fuente comercial de PUFAs está representada por el aceite de pescado marino (Sahena et al. 2009). Sin embargo, se encuentran diferentes contenidos de ácidos grasos, dependiendo de la especie, estación, clima, disponibilidad y tipo de cadena alimentaria primaria (Sidhu 2003). El aceite de pescado además de su costosa producción, está siendo afectado en su composición por componentes con cierta toxicidad como metales pesados (Conchillo et al. 2006) por lo que existe actualmente un esfuerzo por conseguir Omega-3 a partir de otras fuentes como los crustáceos (krill), los vegetales (semillas de lino, cáñamo, chía, calabaza y frutos secos como la nuez) y las microalgas (*Schizochytrium* sp.) (Sarker et al. 2016). Hasta el momento las algas marinas se han utilizado como un suplemento alimenticio para aves de corral en la producción de huevos con alto contenido en PUFAs (Lemahieu et al. 2016), por lo que, además de emplearse en alimentación humana, las algas podrían ser también utilizadas en la acuicultura para mejorar el contenido de PUFAs en el pescado, los cuales se destinarían para consumo humano (Dantagnan et al. 2009).

6.2.2. Carbohidratos

Las algas marinas se emplean en todo el mundo como fuente principal de agentes espesantes y gelificantes (Lee et al. 2017). Estos compuestos son polisacáridos que se encuentran en las paredes celulares. Estos compuestos son conocidos como alginatos, carragenatos y agares, entre otros y son los llamados "ficocoloides" (Friedlander & Zelikovitch 1984, Florez et al. 2017). Dentro del gran grupo de macromoléculas como son los carbohidratos, en la actualidad la comunidad científica se ha interesado por los polisacáridos sulfatados (PSs). A pesar del enfoque de los PSs en las aplicaciones de la industria alimentaria, en los últimos años, la atención se ha desplazado a la explotación de potenciales actividades biológicas y propiedades farmacológicas (Abu-Ghannam & Rajauria 2013).

Los estudios que tienen como objetivo evaluar la importancia de la estructura molecular de polisacáridos sobre la bioactividad son cruciales. Muchos estudios se han centrado en diferentes actividades biológicas de PSs como actividad anti-inflamatoria (Wu et al. 2016), la actividad antioxidante (Fleita et al. 2015), la actividad antimicrobiana (Abu-Ghannam & Rajauria 2013),

anticoagulante y antitrombótica (Grauffel et al. 1989; Pereira et al. 2005), inmunológica (Stephanie et al. 2010) y anticancerígena (Anastyuk et al. 2012). La elucidación estructural de los polisacáridos de algas es necesaria para correlacionar sus propiedades físico-químicas con sus propiedades bioactivas. El conocimiento de estas estructuras químicas podría conducir a la mejora de las propiedades bioactivas mediante modificaciones específicas (químicas, físicas o enzimáticas) teniendo en cuenta que la actividad biológica (bioactividad) es dependiente de la estructura molecular (Courtois 2009).

Además, los PSs también han atraído un creciente interés debido a sus propiedades físicas, como la capacidad de gelificación, de espesamiento y de estabilización (Liu et al. 2015). Sin embargo, actualmente la investigación sobre la elucidación química de los productos de algas con actividad farmacéutica, es la parte de la glicobiología algal que más está creciendo, principalmente con respecto a la estructura binomial frente a la actividad biológica.

6.2.3. Clorofilas

Existen más de 100 tipos de clorofilas diferentes con diferentes estructuras y sustituyentes. Estos pigmentos, tradicionalmente, han sido utilizados como agentes colorantes para grasas y aceites además de su consumo oral por sus propiedades antioxidantes (Devasagayam et al. 2004; Lanfer-Marquez et al. 2005). Los pigmentos se extraen de fuentes naturales y se utilizan ampliamente en tintes para colorear, en resinas, en jabones y ceras, en grasas comestibles, en cosméticos y en enjuagues bucales entre muchos otros usos (Mortensen 2006; Sigurdson et al. 2017). El consumo/uso de estos pigmentos se ha asociado con beneficios potenciales para la salud, y hoy en día, todavía se pueden encontrar anuncios de muchos productos que contienen clorofila, sobre todo suplementos dietéticos y nutracéuticos (Schoefs 2002).

Los hallazgos de investigación sobre las bioactividades de la clorofila se hicieron más accesibles a la comunidad científica en los años 80 (Sato et al. 1986). Más recientemente, se han discutido los posibles efectos antimutagénicos, antiapoptóticos y quimiopreventivos de la clorofila en el cuerpo humano (Egner et al. 2003; Kumar et al. 2004; Ferruzzi & Blakeslee 2007) y se han investigado otras actividades biológicas como la prevención de la diabetes (McCarty 2001), la protección contra los efectos deletéreos del estrés oxidativo, la protección frente a la radiación en terapias frente al cáncer (Ouameur et al. 2005) o incluso efectos inmunomoduladores de la actividad de las enzimas implicadas en el proceso de detoxificación de los xenobióticos (Sharma et al. 2007).

6.2.4. Carotenoides

En la naturaleza se han encontrado más de 750 carotenoides presentes en plantas terrestres, hongos, bacterias y algas, de los cuales, unos 250 son exclusivamente de origen marino (Maoka 2011).

Aunque se han encontrado muchos carotenoides en la naturaleza, aproximadamente 40 de ellos pueden ser absorbidos, metabolizados y utilizados en el cuerpo humano y alrededor de seis de estos pueden ser detectados en el suero sanguíneo (Britton & Khachik 2009). Algunos de los carotenoides (aproximadamente el 10%) pueden ser metabolizados en vitamina A (retinol). Los carotenoides son utilizados en la industria farmacéutica y cosmética (Wang & Curtis 2015) y algunos de estos se encuentran exclusivamente en algas (Jeffrey & Vesk 1997).

Tradicionalmente, los carotenoides se han venido utilizando como colorantes en el sector alimentario. De toda la variedad de carotenoides existentes en la naturaleza, solo algunos de ellos, se han aislado y utilizado comercialmente (Vílchez et al. 2011). En la actualidad, existe una fuerte demanda de pigmentos naturales en lugar de los obtenidos mediante síntesis química, ya que se sospecha que los compuestos de origen sintético podrían ser promotores para la carcinogénesis además de producir toxicidad hepática y renal (Abd et al. 2007). Desde entonces, los carotenoides naturales empezaron a usarse en la industria alimentaria, sustituyendo a los sintéticos (Kelloff et al. 2000). Así pues, los carotenoides pueden utilizarse en alimentos y bebidas para mejorar las propiedades organolépticas (zumos de frutas, refrescos, confitería, margarinas, productos horneados y lácteos) y en productos nutracéuticos debido, entre otros, a las propiedades antioxidantes que presentan (Burton & Ingold 1984). Por lo tanto, los carotenoides se pueden aplicar en el ámbito de la alimentación animal para enriquecer el color amarillo en los huevos, mejorar el color de las aves, de los peces y los crustáceos, mejorar la apariencia de los alimentos para mascotas y mejorar los piensos para la acuicultura (Dufossé et al. 2005; Spolaore et al. 2006).

Los carotenoides, ejercen un rol bioactivo en los seres vivos formando parte de los sistemas de defensa antioxidante actuando contra el daño oxidativo mediante la protección de la fracción lipofílica de las células principalmente evitando la peroxidación lipídica y mediante neutralización de especies reactivas de oxígeno (Polyakov et al. 2001). Varios estudios indican que una dieta rica en carotenoides puede reducir el riesgo de una variedad de trastornos humanos mediados por los radicales libres. Estos componentes actuarían previniendo el daño oxidativo (Jin et al. 2003; Christaki et al. 2010, 2013). En la actualidad, los datos epidemiológicos apoyan la existencia de un efecto protector de los carotenoides en el desarrollo del cáncer (Vílchez et al. 2011).

6.2.5. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos o fenoles, son una clase numerosa y diversa de metabolitos secundarios que comprenden una familia de más de 8000 compuestos naturales los cuales poseen funcionalidades biológicas relacionadas principalmente con sus propiedades antioxidantes (Croteau et al. 2000). Estos son compuestos orgánicos en cuyas estructuras moleculares contienen al menos un grupo fenol, un anillo aromático unido, al menos, a un grupo funcional (Vermerris & Nicholson 2008).

Estos fitoquímicos son bien conocidos y pueden clasificarse en diferentes grupos estructurales que van desde fenoles simples hasta moléculas complejas como los ácidos fenólicos, cumarinas, taninos, ligninas, lignanos, estilbenos y flavonoides entre otros (Khoddami et al. 2013). Los compuestos fenólicos se biosintetizan principalmente a través de dos vías, la del ácido shikímico y la del acetato-malonato (Tsao 2010). Cuando se trata de compuestos complejos como los flavonoides, se requieren ambas para su biosíntesis (Fatland et al. 2002). También, recientemente se ha hipotetizado que ciertos compuestos bromofenólicos que contienen nitrógeno en su estructura molecular, podrían actuar además como reservorio de nitrógeno en algas (Li et al. 2012).

Dentro del grupo heterogéneo de compuestos fenólicos, están cobrando un mayor interés los compuestos fenólicos que contienen algún elemento halógeno en su composición. En concreto, los más estudiados por su capacidad bioactiva, son los compuestos bromofenólicos (BFs). Los primeros dos BFs fueron aislados del alga roja *Rhodomela larix* (Katsui et al. 1967) y posteriormente, se aislaron e identificaron muchos otros BFs nuevos de diversas especies de algas marinas, incluyendo algas rojas (Pedersén et al. 1974), algas pardas (Chung et al. 2003) y algas verdes (Flodin et al. 1999). Recientes estudios han revelado que los BFs muestran un amplio espectro de actividades biológicas beneficiosas en células animales (Kim et al. 2008, Kim et al. 2010), y por lo tanto han atraído mucha atención en el campo de los alimentos funcionales y en el ámbito farmacológico.

7. Cultivo de algas: del laboratorio a escala piloto

El cultivo y producción de algas a gran escala todavía presenta una serie de desafíos (Rawat et al. 2013). La selección de la especie para que se adapte eficazmente a los requerimientos de cultivo, es de suma importancia para lograr el éxito en la productividad de biomasa algal (Chisti 2007). Idealmente, las especies seleccionadas a través de la ficoprospección, deben equilibrar los requerimientos de crecimiento con la producción de co-productos de valor agregado así como encontrar el mejor ajuste de características para las condiciones climáticas y la ubicación seleccionada (Rawat et al. 2013). En condiciones de crecimiento exterior, se ha demostrado que una amplia variedad de algas muestran variaciones estacionales, por lo que un estudio exhaustivo de la dinámica de la población resulta crucial. Esto es generalmente difícil y se requiere de un cribado previo de un gran número de especies si se pretende cultivar una especie novedosa (Wilkie et al. 2011).

Los principales problemas técnicos a la hora del escalado, son el mantenimiento de la integridad del cultivo, el mantenimiento de la actividad fotosintética óptima, y el intercambio gaseoso además de la contaminación por otras algas, bacterias, herbívoros o cualquier otro organismo (Brennan & Owende 2010, Jorquera et al. 2010; Christenson & Sims 2011). El biofouling, ocasionado por la

contaminación de otras especies, se convierte en un grave problema si los organismos se adhieren a las paredes del tanque dificultando la penetración de la luz, provocando sombreado y reduciendo así la productividad por disminución de la tasa fotosintética (Rawat et al. 2013). Además, esto impediría el flujo del cultivo, requiriendo más energía y disminuyendo así la productividad (Day et al. 2012). Así pues, especies que posean estrategias de defensa química frente a estas especies, serían candidatas ideales para el cultivo a gran escala (Paul & Pohnert 2011). El uso de medios nutricionales de cultivo artificial a gran escala no es económicamente viable, por lo que es conveniente formular medios nutritivos alternativos que sean más baratos y más con disponibilidad de mercado. Estos podrían ser fertilizantes agrícolas de origen ecológico, o aguas residuales de distinta índole, las cuales tienen una carga importante en nutrientes disueltos fundamentalmente nitrogenados y fosforados (Hernández et al. 2006; Marinho-Soriano et al. 2011; Buschmann et al. 2017).

El suministro de radiación fotosintéticamente activa (PAR) también se convierte en un factor limitante en cultivos de alta densidad tanto en sistemas abiertos como en cerrados, reduciendo así la productividad (Grobbelaar 2009). El suministro de CO₂ es esencial para la prevención de la limitación del carbono. Menos del 10% de los recursos de CO₂ están disponibles para las algas para su captación. El burbujeo del aire no es un sistema eficaz de suministro para estanques abiertos debido al corto tiempo de residencia (Moffitt & Cajas-Cano 2014) por lo que la optimización de la tecnología de aireación sigue siendo un reto de ingeniería actualmente. La eliminación del oxígeno también es imprescindible para la prevención del estrés fotooxidativo en fotobiorreactores. Dentro de todas las variables que más afectan al cultivo, los nutrientes y la radiación serían quizás las variables más importantes para optimización del cultivo. Además, la manipulación de estas variables servirían para la inducción de las especies a la producción de alto valor añadido (Figueroa et al. 2010). La gestión exitosa de estas variables interrelacionadas, es esencial para la elección de la ubicación geográfica del cultivo para la implementación de biorrefinerías con posibilidades de muchos beneficios económicos y ambientales (Jiang et al. 2016).

7.1. Nutrientes

Como se mencionó anteriormente, resulta técnica y económicamente inviable, la utilización de medios de cultivo artificiales para el cultivo de algas a gran escala. Por lo tanto, la investigación actual está encaminada en la producción de algas usando la capacidad que estas poseen para biofiltrar residuos (Ge & Champagne 2017). La investigación sobre el uso de macroalgas en sistemas de depuración de aguas para que actúen como biofiltro, comenzó en los años 70 (DeBoer & Ryther 1977, Harlin 1978). Durante la última década se ha dado un impulso a la investigación en este campo publicándose numerosos estudios que demuestran que las aguas procedentes de acuicultura intensiva y semi-intensiva pueden ser medio de cultivo adecuado para el crecimiento y la producción intensiva de

macroalgas que a su vez tendrán un papel biofiltrador de dichos efluentes (Abreu et al. 2011b; Figueroa et al. 2012; Buck et al. 2017).

La selección de especies a través de la ficoprospección de algas con características adecuadas tanto para la producción de recursos biológicos como para la mitigación de desechos, es el camino más sostenible para el desarrollo generalizado de recursos basado en algas (Figura I.3) (Fang et al. 2016).

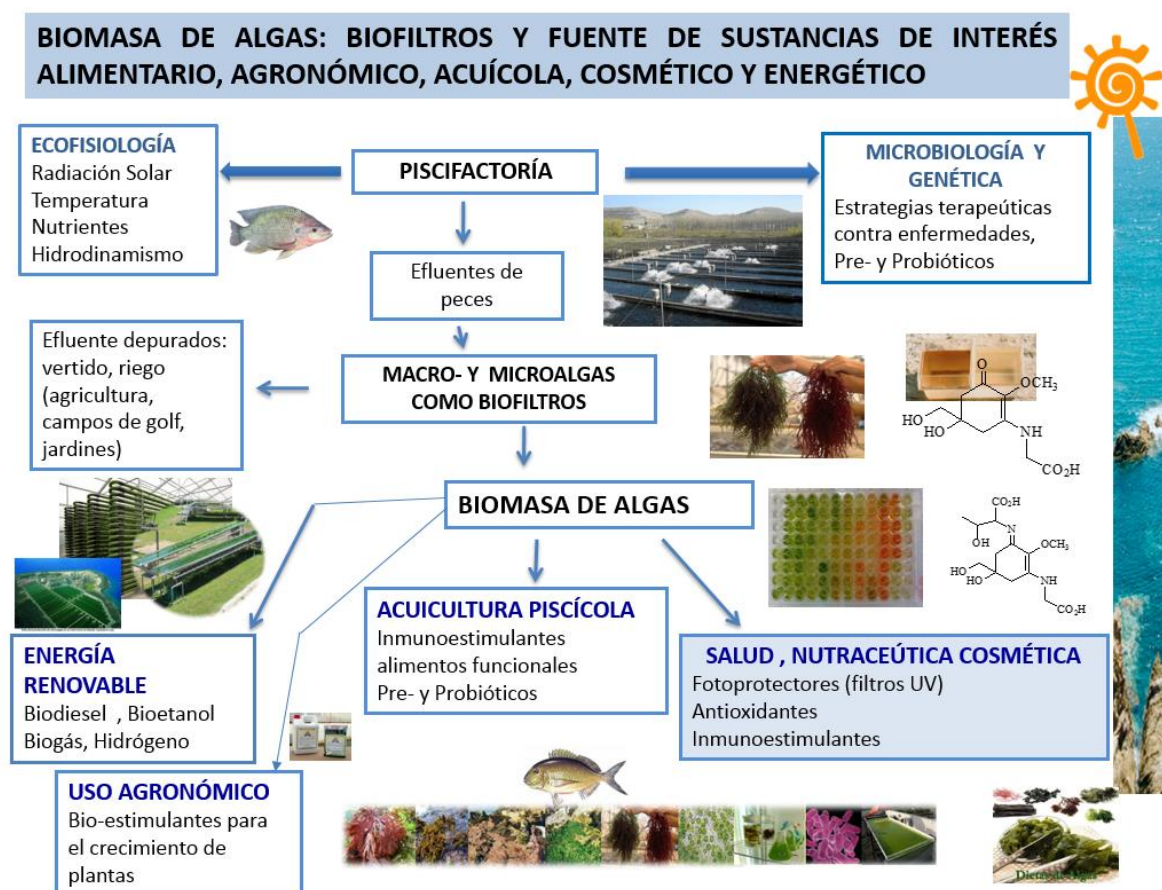


Figura I.3. Uso de las algas como biofiltro para la depuración de aguas procedentes de la industria acuícola. La biomasa obtenida sería encaminada a la obtención de compuestos de distinta índole y con un valor agregado.

Las macroalgas pueden retirar cantidades significativas de nutrientes orgánicos e inorgánicos. Las principales fuentes de nitrógeno (N) para macroalgas son el N inorgánico (NO_3^- y NH_4^+) y el N orgánico (fundamentalmente urea y aminoácidos), aunque muestran, generalmente, preferencia por el N-NH_4^+ (D'Elia & DeBoer 1978; Haines & Wheeler 1978; Harlin 1978; Döhler et al. 1995). El aumento de la disponibilidad de N bajo condiciones favorables de cantidad y calidad lumínica, como proceso fotorregulador, favorece la acumulación de pigmentos fotosintéticos (Rüdiger & López-Figueroa 1992) y compuestos fotoprotectores nitrogenados como los MAAs (Korbee et al. 2004a; Figueroa et al. 2012; Barceló-Villalobos et al. 2017) y también compuestos no nitrogenados como los compuestos fenólicos

(Celis-Plá et al. 2016). Sin embargo, por otro lado, la privación de N en el medio de cultivo favorece la síntesis y acumulación de lípidos (Griffiths & Harrison 2009), carbohidratos o carotenoides (Dragone et al. 2011; Lamers et al. 2012) en algas.

7.2. Radiación Ultravioleta

Desde un punto de vista biotecnológico, las algas expuestas a UVR (del inglés, *Ultra Violet Radiation*), pueden ser inducidas, potencialmente, a la síntesis y acumulación de compuestos derivados del metabolismo secundario: fotoprotectores, compuestos fenólicos, carotenoides u otras sustancias cuyo rol biológico en el organismo fotosintético, es la fotoprotección frente a UVR (Korbee et al. 2005; Roleda et al. 2012; De Oliveira et al. 2016). Otras estrategias ecofisiológicas son la biosíntesis de moléculas con propiedades antioxidantes, el incremento del grosor de la pared celular y la adopción de cambios morfológicos y estructurales a nivel celular (Schmidt et al. 2010; Figueroa et al. 2014). La UVR, por lo tanto, puede ser un mecanismo muy útil para inducción o estimulación del metabolismo secundario en algas. Numerosos estudios han demostrado como esta calidad espectral incrementa la carotenogénesis (Jahnke 1999, White & Jahnke 2002), la síntesis de compuestos fenólicos (Pavia et al. 1998), de MAAs (Korbee et al. 2004a) y de escitoneminas (Dillon et al. 2002). Además, la UVR induce a la síntesis y activación de otras sustancias implicadas en la protección y detoxificación de productos metabólicos relacionados con el estrés oxidativo como las enzimas antioxidantes (Aguilera et al. 1991; Franklin & Forster 1997).

8. Estrategias de optimización para la obtención de productos con alto valor añadido

El inducir a los organismos mediante estrategias fotorreguladoras y nutritivas para controlar la síntesis de compuestos de interés, es una práctica que está siendo aplicada y extendida en la actualidad (Xue et al. 2005; Griffiths et al. 2016). El contenido de N y P en el cultivo, resulta esencial ya que numerosos mecanismos de reparación celular para los daños causados por exposición a UVR, requieren de nitrógeno para la biosíntesis de enzimas y moléculas nitrogenadas las cuales se encuentran involucradas en estos procesos (Roy 2000). De lo contrario, la limitación de N en el medio acuático aumenta la sensibilidad a UVR y provoca una disminución de la fotosíntesis (Litchman et al. 2002). El aumento de la disponibilidad de N bajo condiciones favorables de cantidad y calidad lumínica, como proceso fotorregulador, favorece la acumulación de pigmentos fotosintéticos (Rüdiger & López-Figueroa 1992) y compuestos fotoprotectores nitrogenados como los MAAs (Korbee et al. 2004a; Figueroa et al. 2012) y no nitrogenados como los compuestos fenólicos (Celis-Plá et al. 2016). Sin embargo, por otro lado, la privación de N en el medio de cultivo favorece la síntesis y acumulación de lípidos (Griffiths & Harrison 2009), carbohidratos o carotenoides (Lamers et al. 2012) en algas (Dragone et al. 2011).

El efecto interactivo entre la UVR y la disponibilidad de nitrógeno macroalgas rojas se ha observado en numerosos estudios (Korbee et al. 2004a; Huovinen et al. 2006; Barufi et al. 2011; Figueroa et al. 2014). Tanto la calidad y cantidad de radiación recibida, como el contenido nitrogenado del medio de cultivo, se ha observado que influye notoriamente en la acumulación de MAAs en experimentos realizados en laboratorio (Korbee et al. 2006).

La optimización del crecimiento de las algas mediante el monitoreo de la actividad fotosintética se ha convertido en una técnica común y extendida en la biotecnología algal (Figueroa et al. 2013). Este método, permite monitorear el estado fisiológico y el rendimiento fotosintético de los organismos fotosintéticos en sistemas de cultivo. La monitorización de la fluorescencia *in vivo* de la clorofila *a* ha demostrado ser una técnica adecuada para medir el rendimiento fotosintético de una forma rápida, no intrusiva y sencilla (Figueroa et al. 2017). El monitoreo de la producción fotosintética también ha tenido éxito en el cultivo de macroalgas en efluentes de estanques de peces, siendo la tasa de transporte electrónico un buen estimador de la capacidad fotosintética (Figueroa et al. 2006). Las investigaciones actuales en esta materia, están encaminadas a correlacionar la productividad de la biomasa real (medida mediante pesaje) con la productividad de la biomasa estimada a partir de la producción fotosintética (obtenida a partir de la tasa de transporte electrónico, ETR) además de controlar las actividades fotoquímicas y la fisiología del alga objeto de cultivo (Jerez et al. 2016). La información obtenida por esta técnica resulta de vital importancia y facilita la gestión de los cultivos algales con el objetivo de maximizar la producción de biomasa, ya que estas variables fisiológicas se encuentran estrechamente vinculadas con la actividad fotobioquímica y por ende, con la síntesis de compuestos derivados del metabolismo secundario los cuales se pretenden obtener con el mayor rendimiento posible (Masojidek et al. 2010; Figueroa et al. 2013).

9. Biorrefinería

El enfoque de la biorrefinería de algas incluye la utilización completa de la biomasa producida para la producción de productos de alto valor añadido como son alimentos y piensos, cosméticos y productos químicos finos, además del mercado de biocombustibles (Eppink et al. 2017). El coste de producción de las algas sigue siendo alto para la producción de biocombustibles (entre 5 y 50 € kg⁻¹) mientras que el coste de los biocombustibles es inferior aún (0.5 € kg⁻¹). Además, la capacidad de producción sigue siendo varios órdenes de magnitud inferior a la requerida para cumplir los requisitos del mercado de biocombustibles (la capacidad de producción es inferior a 10 kT año⁻¹ mientras que la capacidad requerida es > 50000 kT año⁻¹). Así pues, el enfoque de la biorrefinería, que incluye la producción de productos de alto valor añadido (con cotizaciones de mercado de hasta 3000 € kT año⁻¹), permitirá incrementar los ingresos potenciales por unidad de biomasa algas y posterior explotación

rentable en cuanto a la obtención de biocombustibles como co-producto obtenido en el contexto de la biorrefinería.

Dentro del marco de la biorrefinería, el enfoque fotobiológico puede ayudar a aumentar la acumulación de compuestos específicos mediante el control del metabolismo, a través de estrategias fotorreguladoras y usando calidades lumínicas específicas, las cuales favorezcan la acumulación de compuesto carbonados o nitrogenados. Además, el crecimiento de la biomasa bajo estresores como UVR y/o la privación de nutrientes, puede optimizar la biosíntesis y posterior acumulación de sustancias de alto valor añadido, como fotoprotectores, antioxidantes e inmunoestimulantes.

10. Usos cosmecéuticos de los compuestos bioactivos procedentes de algas.

En la década de los 90, surgió el término “cosmecéutica”. Este término deriva de la combinación de las palabras cosméticos y productos farmacéuticos, lo que indica que es per se, un producto específico que contiene ingredientes biológicamente activos (compuestos bioactivos) (Vermeer et al. 1996).

La cosmecéutica, como concepto diferenciado de la cosmética clásica, se caracteriza por su alta actividad biológica sobre el tejido dérmico y que, además de buscar el embellecimiento de los consumidores, aporta funcionalidades biológicas en la piel. Por lo tanto, la primera característica de la cosmecéutica, viene definida por el tipo de principio activo que contiene y por su concentración. Cada principio activo tiene un umbral de concentración en la fórmula final, por encima del cual se obtienen resultados verdaderamente efectivos testados científicamente, mientras que por debajo de estas concentraciones no se consigue ningún efecto. Las sustancias bioactivas derivadas de algas marinas, pueden brindar propiedades excepcionales a los cosméticos dotándolos de propiedades beneficiosas para la piel (Kim et al. 2008; Babitha & Kim 2011; Wijesinghe & Jeon 2011; Jahan et al. 2017).

10.1. Antioxidantes

Los compuestos bioactivos citados en el apartado 5.1, además de otras propiedades bioactivas, también presentan capacidad antioxidante inherentes a su naturaleza química (Cornish & Garbary 2010). La investigación sobre la composición de los extractos algales se refiere principalmente a los antioxidantes naturales como una alternativa a los antioxidantes sintéticos, siendo importante reemplazar estos compuestos sintéticos por antioxidantes que tengan un origen natural (Sabeena Farvin & Jacobsen 2013). Los compuestos antioxidantes de fuentes marinas presentan actividades antioxidantes relativamente más altas, en comparación con los antioxidantes comerciales como son el BHA (hidroxibutilanisol) y el BHT (Butilhidroxitolueno) los cuales se aplican en muchos productos y

alimentos (Abd El-Baky et al. 2010). Los compuestos antioxidantes son biosintetizados, en todos los seres vivos para contrarrestar los daños biológicos causados por la oxidación de moléculas. En las algas, se producen especies reactivas de oxígeno (ROS; del inglés Reactive Oxygen Species) y de nitrógeno (RNS; del inglés Reactive Nitrogen Species) consecuencia de la realización de fotosíntesis oxigénica y en mayor medida dependiendo del nivel de estrés al que se vean sometidas en sus hábitats (Trostchansky et al. 2016). A pesar de su exposición a RS (ROS + RNS) perjudiciales, las algas carecen de daño oxidativo en sus componentes estructurales al poseer sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos con una amplísima diversidad molecular (Tabla I.1). Estos antioxidantes, puede ser extraídos a partir de la biomasa algal y empleados en innumerables aplicaciones (Wells et al. 2016).

Numerosos estudios han confirmado fuertes propiedades antioxidantes de compuestos aislados de algas marinas (O'Sullivan et al. 2011), sin embargo, poco se conocen de los efectos antioxidantes de los extractos algales en su conjunto y mucho menos de las sinergias entre estos (Miyashita 2014). Los antioxidantes neutralizan los RS mediante reacciones de oxidorreducción, quelación de metales de transición y disolviendo compuestos de peroxidación (Gupta & Abu-Ghannam 2011). La utilización de antioxidantes algales, evitan la oxidación de los componentes, inhibiendo la formación de productos como resultado de la oxidación (Gupta & Abu-Ghannam 2011).

Tabla I.1. Principales sistemas antioxidantes en algas.

No enzimático	Antioxidantes hidrosolubles	Referencias
	Vitamina C (ácido ascórbico)	Farasat et al. (2014)
	Otras vitaminas	Noda (1993)
	Ficobiliproteínas	Romay et al. (2003b)
	Proteínas y péptidos	Sheih et al. (2009)
	Compuestos fenólicos	Prior et al. (1998)
	MAAs	De La Coba et al. (2009)
	Antioxidantes liposolubles	
	Carotenoides	Hu et al. (2008)
	Clorofilas	Lanfer-Marquez et al. (2005)
	Vitamina E (tocoferoles)	Fryer (1992)
	¹ PUFAs	Kumar et al. (2011)
	Polisacáridos	Shao et al. (2014)
	¹ DMSP y ² DMS	Sunda et al. (2002)
Enzimático	Superóxido dismutasa (SOD)	Mallick & Mohn (2000)
	Peroxidasa (POD)	
	Catalasa (CAT)	
	Glutación reductasa (GR)	
	GSH (glutación reducido)	

¹PUFAs: ácidos grasos poliinsaturados (del inglés: *Polyunsaturated fatty acids*)

²DMSP: dimetilsulfoniopropionato

³DMS: dimetilsulfóxido

Por lo tanto el uso de antioxidantes a partir de fuentes algales, neutralizarían los RS los cuales se han identificado como agentes en varias enfermedades tanto en la dermis como a nivel sistémico

(Devasagayam et al. 2004). Estos incluyen cáncer, enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis, hipertensión, isquemia, reperfusión, diabetes mellitus, Alzheimer y Parkinson, artritis reumatoide y envejecimiento (Hernandez-Ledesma & Herrero 2013). Actualmente, los RS han sido implicados en más de 150 trastornos humanos, que van desde el shock hemorrágico, a través de cardiomiopatía, la fibrosis quística, el virus de la inmunodeficiencia humana e incluso la alopecia masculina (Halliwell & Gutteridge 2007).

Las complejidades funcionales asociadas con los mecanismos de defensa antioxidantes son diversas, y su importancia relativa frente a las especies reactivas *in vivo* depende de cómo, dónde y qué especies reactivas (RS) se generan y qué objetivo de daño se mide. Por ejemplo, los compuestos fenólicos son bien conocidos potentes antioxidantes, pero su amplia diversidad y complejidad química hace que sea difícil correlacionar la potencia antioxidante *in vitro* con la actividad biológica específica *in vivo* (Scalbert et al. 2005). Si se considera la comercialización de las algas marinas por su actividad antioxidante, se requieren investigaciones adicionales para establecer la biodisponibilidad de compuestos específicos (Frankel & Finley 2008) además de garantizar la producción de productos estandarizados que los contengan (Jormalainen & Honkanen 2004).

10.2. Citotoxicidad

Los efectos citotóxicos de los extractos algales sobre diferentes líneas celulares están siendo estudiados en la actualidad en gran medida por los requerimientos de seguridad de la industria cosmética (Isnansetyo et al. 2017; Tannoury et al. 2017). Dentro de estos estudios, la actividad citotóxica en líneas celulares cancerosas y tumorales, se ha convertido en una de las especificidades más perseguidas y más importantes que presentan las algas, y muchas especies están demostrando poseer estos efectos bioactivos (Khalifa et al. 2016; Anastyyuk et al. 2017). También, en el ámbito dermocosmético, la industria investiga nuevos componentes de aplicación en sus productos que posean efectos citotóxicos en melanoma y otros desórdenes de la piel (Teas & Irhimeh 2017) pero que no resulten citotóxicos en células dérmicas cuyo funcionamiento sea fisiológicamente normal (Zheng et al. 2016). Los polisacáridos de *Hydropuntia cornea*, han demostrado tener efectos antivirales y antiparasitarios (Mazumder et al. 2002; Moo-Puc et al. 2008) y los extractos de *Gracilariopsis longissima*, han demostrado poseer propiedades antimicrobianas (Stabili et al. 2010, 2012) así como antidiabética originada por su composición lipídica (Saeidnia et al. 2012).

Los compuestos bioactivos algales (tanto en extractos como de forma aislada) poseen efecto citotóxico en células cancerosas y tumorales así como actividad inmunomoduladora (Xu et al. 2004; Abdala-Díaz et al. 2010; Abdala et al. 2011; Romano et al. 2017). La investigación en este ámbito también se centra en dilucidar que compuestos concretos ejercen dichas bioactividades, aunque las sinergias que acontecen en los extractos algales, suscitan un mayor interés por la parte de la comunidad

científica ya que esto supone un aumento considerable de la capacidad bioactiva debido a la interacciones que se dan entre las sustancias (Choi et al. 2017).

10.3. Propiedades inmunológicas

Respecto a las propiedades inmunológicas de los compuestos obtenidos a partir de las algas, los estudios que se llevan a cabo pretenden inducir en macrófagos secreciones de citoquinas (interleucina IL-6), y activación de factores de necrosis tumoral (TNF- α), así como mediadores de inflamación como el óxido nítrico (NO) entre otros (Abdala et al. 2011). El papel principal del TNF- α es la regulación de las células inmunes, sin embargo, también se ha demostrado que reduce la replicación viral. Esta citoquina está implicada en la inflamación sistémica y estimula la reacción en fase aguda. Por otro lado, IL-6 es una citoquina multifuncional que puede ser proinflamatoria o antiinflamatoria dependiendo de la línea celular de que se trate y que regularía varias respuestas inmunes, incluyendo reacciones de fase aguda, y participando como un mediador de la respuesta inflamatoria. Su producción es inducida por varios factores, incluyendo TNF- α , IL-1 β y lipopolisacáridos de endotoxina bacteriana (Martinez et al. 1998).

Dentro de la diversidad molecular presente en las algas, los polisacáridos son quizás los componentes que más peso tienen en cuanto a los efectos inmunológicos y que más se han estudiado. En concreto, los polisacáridos sulfatados pueden desencadenar la estimulación celular o humoral del sistema inmune humano (Namikoshi & Rinehart 1996). Las fracciones efectivas de polisacáridos se encontraron principalmente en cianobacterias, aunque recientemente, cada vez más se pone de manifiesto la potencialidad de los compuestos de algas rojas y verdes como potentes agentes inmunomoduladores (Liu et al. 2017; Qi & Kim 2017).

10.4. Fotoprotección

El uso de cosméticos para tratar la apariencia y la condición de la piel es común entre muchas culturas. La palabra "cosméticos" surge de una palabra griega "kosmetikos" que significa adornar (Korać & Khambholja 2011). Desde entonces, cualquier material utilizado para la mejora de la apariencia se conoce como "cosmético". Esto hizo que la ciencia se interesara por la investigación cosmética y como resultado, más y más productos fueron desarrollándose y comercializándose pero, actualmente, un gran parte de la población mundial está mostrando una mayor inclinación hacia los cosméticos que tenga un origen natural preferentemente antes que un origen artificial o sintético (Vimaladevi 2005).

Las algas, al contener en su composición una gran cantidad y variedad de compuestos bioactivos, han ganado un importante relevancia en el desarrollo de productos cosmecéuticos (Wang et al. 2014; Ariede et al. 2017) los cuales entre otras muchas propiedades que aportan al cosmético,

aumentan la fotoprotección y la capacidad antioxidante de la piel (Jahan et al. 2017). Estos compuestos proporcionan una protección de amplio espectro contra los efectos nocivos de la UVR (tanto A como B) y contra los radicales libres que se originan durante la exposición solar (Lim et al. 2017). La acumulación de radicales libres conduce a patologías relacionadas con el fotoenvejecimiento como son la inflamación cutánea, el melanoma y cáncer de piel de otras patologías (Pallela et al. 2010). Así pues, la competencia entre los fabricantes de cosméticos es intensa. Debido a ello, las empresas actualmente formulan con ingredientes de alto valor añadido y con propiedades bioactivas para crear nuevos productos que pueden reclamar beneficios específicos (Korać & Khambholja 2011). Ha habido un progreso considerable en la comprensión de los metabolitos algales y su posible aplicación como nuevos y potentes componentes en cosmeceúticos debido a que el medio marino es una rica y poderosa fuente de diversidad biológica y química, donde la industria biotecnológica ha puesto su punto de mira. El negocio global actual de la industria cosmética para el cuidado de la piel, se estima en miles de millones de dólares y augura un aumento más acusado en los próximos años (Jahan et al. 2017). La vehiculización de estos componentes algales, en concreto los MAAs, en formulaciones cosméticas de uso tópico, presentan valores de FPS similares a productos cosméticos que contienen filtros solares (de UVA y UVB) comerciales de origen sintético al mismo porcentaje (De la Coba 2007). Los MAAs no solo son efectivos contra el eritema actínico sino que también pueden fotoproteger de otros efectos biológicos como inmunosupresión o daño oxidativo (López Figueroa et al. 2009).

Respecto a la fotoprotección, se ha propuesto un factor de protección solar más amplio denominado FAPEB (factor de protección frente a efectos biológicos) que el factor de protección solar (FPS) usado de forma clásica por la industria cosmética y formulado sólo para el eritema (López-Figueroa et al. 2009). Ensayos *in vivo* con animales de experimentación también demostraron la capacidad fotoprotectora de estos MAAs. La aplicación tópica del aminoácido tipo micosporina Porphyrin-334, limitó de manera efectiva el desarrollo de reacciones fotoquímicas y bioquímicas de la piel propias del daño actínico agudo (eritema, edema, expresión de la proteína de estrés Hsp72, engrosamiento cutáneo, entre otros) además de contribuir a mantener el sistema defensivo antioxidante de la piel (De la Coba et al. 2009). Estos resultados avalan el gran potencial biotecnológico en la industria cosmética y farmacéutica de estas moléculas como filtros solares, debido a sus propiedades fisicoquímicas: absorción de la radiación UVA y UVB tanto *in vitro* como *in vivo*, gran estabilidad frente a diferentes condiciones de pH y temperatura y propiedades antioxidantes (De la Coba 2007).

Por lo tanto, tal como se ha abordado en esta introducción, a raíz del descubrimiento de las propiedades de las algas en términos de mejora de la salud (propiedades anticancerígenas, inmunomoduladoras, antioxidantes, fotoprotectoras etc.) y el interés creciente del mercado por sustituir los componentes obtenidos mediante síntesis química por componentes naturales, se plantea como objetivo en esta Tesis Doctoral evaluar la presencia y actividad biológica de estos compuestos en

extractos algales, buscar nuevas especies que puedan ser cultivadas con éxito, así como establecer y aplicar estrategias fotorreguladoras (efectos interactivos de la UVR y el nitrógeno) las cuales permitan estimular la producción de estos componentes en un marco ambientalmente sostenible con el fin de aplicar la biomasa producida, en forma de extractos, en diferentes preparados cosméticos. Estos presentarían capacidad fotoprotectora y antioxidante, sin causar citotoxicidad u otros efectos adversos en la en la piel.



Hipótesis

Partiendo de la biodiversidad natural de las macroalgas en un estudio prospectivo, pretendemos encontrar especies con elevadas actividades antioxidantes relacionadas con la composición y concentración de compuestos bioactivos (como proteínas, lípidos, carbohidratos, aminoácidos tipo micosporina, compuestos fenólicos, pigmentos fotosintéticos). Los compuestos asociados al metabolismo secundario responderán de forma prioritaria al estrés ambiental, por lo que en esta Tesis Doctoral nos planteamos experimentar con macroalgas manipulando dos factores, la UVR y los nutrientes. Se ha seleccionado el amonio (NH_4^+) como nutriente a modular pues, además de ser la forma de N inorgánica incorporada preferentemente por las algas, es el que domina en los efluentes de piscifactorías en sistemas de acuicultura multitrófica integrada (IMTA) los cuales se pretenden emular.

En este contexto, la hipótesis es que, las algas crecidas bajo UVR y altos niveles de N-NH_4^+ , acumularán mayor cantidad de compuestos bioactivos de interés biotecnológico, sin comprometer excesivamente la productividad de la biomasa. La aplicación de extractos algales a partir de la biomasa así producida, proporcionará un valor añadido a las formulaciones cosméticas convencionales en términos de fotoprotección, capacidad antioxidante y función inmunomoduladora.



Objetivos

El objetivo de este trabajo en líneas generales es la valoración de los compuestos bioactivos de macroalgas cultivadas en altos niveles de N-NH_4^+ , emulando los efluentes de piscifactorías. Esta biomasa, enriquecida en compuestos bioactivos de alto valor mediante la inducción a partir de estrategias fotorreguladoras (radiación solar o artificial enriquecida con UVR) y nutritivas, dotaría a esta biomasa de un alto valor añadido en los mercados biotecnológicos actuales. Este objetivo se encuentra en sintonía con los principios que rigen los sistemas IMTA y con el concepto de la biorrefinería (Figura O.1).

Para dar cumplimiento a este objetivo general se plantean los siguientes objetivos específicos:

- *Caracterizar y seleccionar* especies de macroalgas con alto potencial de biofiltración para el posterior uso de la biomasa como fuente de productos bioactivos.
- *Evaluar diferentes metodologías de extracción* con diferentes solventes alcohólicos y hidroalcohólicos para la optimización de los procesos de extracción de sustancias bioactivas.
- *Estudiar los efectos interactivos del nitrógeno y la UVR* sobre el crecimiento, fisiología y ultraestructura celular en *Hydropuntia cornea*, *Gracilariopsis longissima* y *Halopithys incurva*.
- *Describir los mecanismos de fotorregulación* de las especies para la inducción de metabolitos secundarios de interés y evaluar los sistemas antioxidantes en base a los tratamientos nutricionales y lumínicos.
- *Determinar las condiciones óptimas de crecimiento* en base a la producción de biomasa, tasa de crecimiento y eficiencia fotosintética de las especies seleccionadas.
- *Estudiar el cultivo de macroalgas* a una escala superior con el fin de evaluar su productividad en términos de biomasa, biofiltración de nutrientes y producción de compuestos bioactivos: del laboratorio a condiciones naturales de radiación solar.
- *Demostrar* las propiedades inmunológicas a partir de ensayos *in vitro* con líneas celulares estandarizadas y evaluar la citotoxicidad.

- *Evaluar el uso de extractos algales en cosmética y su uso como fotoprotector natural.*
- *Elaborar un producto cosmético a partir de extractos obtenidos de las especies estudiadas y otros ingredientes empleados en cosmética natural.*

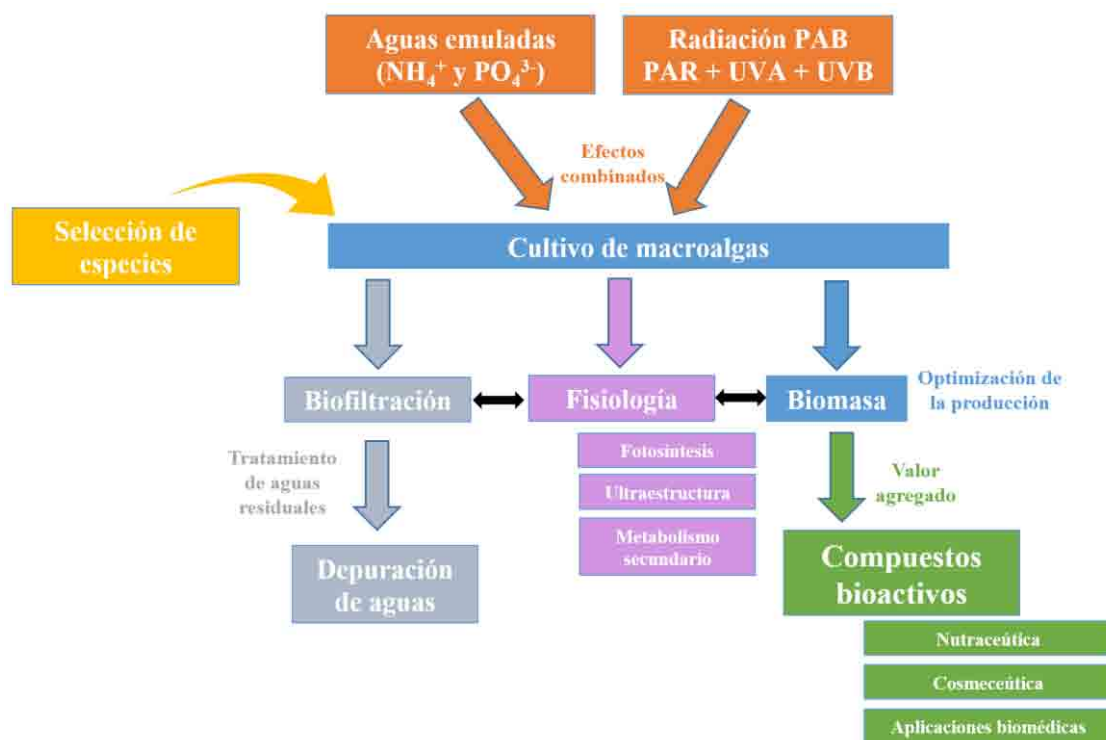


Figura O.1. Esquema general para la interconexión de todos los aspectos que se abordan en esta Tesis Doctoral basado en el concepto de “biorrefinería”.

Material y métodos generales

El material y métodos común a todos los capítulos de esta presente Tesis Doctoral se detalla en el presente apartado “Material y métodos generales”. Los específicos de cada capítulo, se describen y detallan en cada uno de ellos.

1. Medidas de la radiación

La irradiancia espectral fue medida con un espectrorradiómetro Sphere Optics SMS-500 (Contoocook, New Hampshire U.S.A.) (Figura M.1), el cual está dotado de un sensor plano que se coloca perpendicularmente a la fuente de luz y permite determinar la irradiancia en el rango espectral de entre 250-800 nm con una precisión de ± 1 nm. Las unidades en las que expresa la irradiancia son W m^{-2} . Estas unidades energéticas, pueden ser convertidas a unidades fotónicas a partir de la Ley de Planck (Planck 1901).

$$E = (n \cdot c \cdot h \cdot A) / \lambda$$

donde: E = energía (W m^{-2}); n = flujo fotónico ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); c = velocidad de la luz (m s^{-1}); h = cte. de Planck (6.63×10^{-64}); A = número de Avogadro (mol^{-1}) y λ = longitud de onda (nm).



Figura M.1. Espectrorradiómetro Sphere Optics SMS-500 y software informático para el tratamiento de datos.

La irradiancia se monitorizó cada 5 min en el experimento que se llevó a cabo en el **Capítulo 4**, empleando un radiómetro data logger Zippo-HU12-PAR/UV (Figura M.2) dotado con sensores PAR: SQ-212 (400-700 nm) y UVA: LPUVA01 (315-400 nm). Para la extracción de datos, se empleó el software HOBOWare.



Figura M.2. Radiómetro data logger Zippo-HU12-PAR/UV.

1.1. Fuentes de radiación

Se denomina luz (del latín *lux*, *lucis*) a la parte de la radiación electromagnética que puede ser percibida por el ojo humano, esta región espectral está comprendida entre 400-700 nm. En fotobiología, el término luz se usa en un sentido mucho más aplicado e incluye todo el campo de la radiación conocido como espectro electromagnético que tiene relación con algún proceso biológico.

1.1.1. Radiación artificial

Para los experimentos realizados en cámaras de cultivo, se emplearon lámparas que emiten luz en la banda espectral de radiación activa fotosintética (PAR, $\lambda = 400-700$ nm) (Figura M.3A). Las lámparas utilizadas fueron: lámparas fluorescentes, Phillips TL5 HO-ECO 50W (Koninklijke Philips Electronics, Países Bajos). Las lámparas empleadas que emiten luz en la banda del UVA ($\lambda = 315-400$ nm) y en UVB ($\lambda = 280-315$ nm) fueron las QP-340 (Q-Panel, EE.UU.). El espectro electromagnético de esta lámpara presenta un 3.2 y un 70.5% de UVB y UVA respectivamente. Así pues, en el desarrollo de esta Tesis Doctoral se estudian dos combinaciones espectrales: PAR (del inglés, *Photosynthetically Active Radiation*) ($\lambda = 400-700$ nm) y PAB: PAR+UVA+UVB ($\lambda = 280 - 700$ nm) las irradiancias y dosis que se detallan en la Tabla M.1.

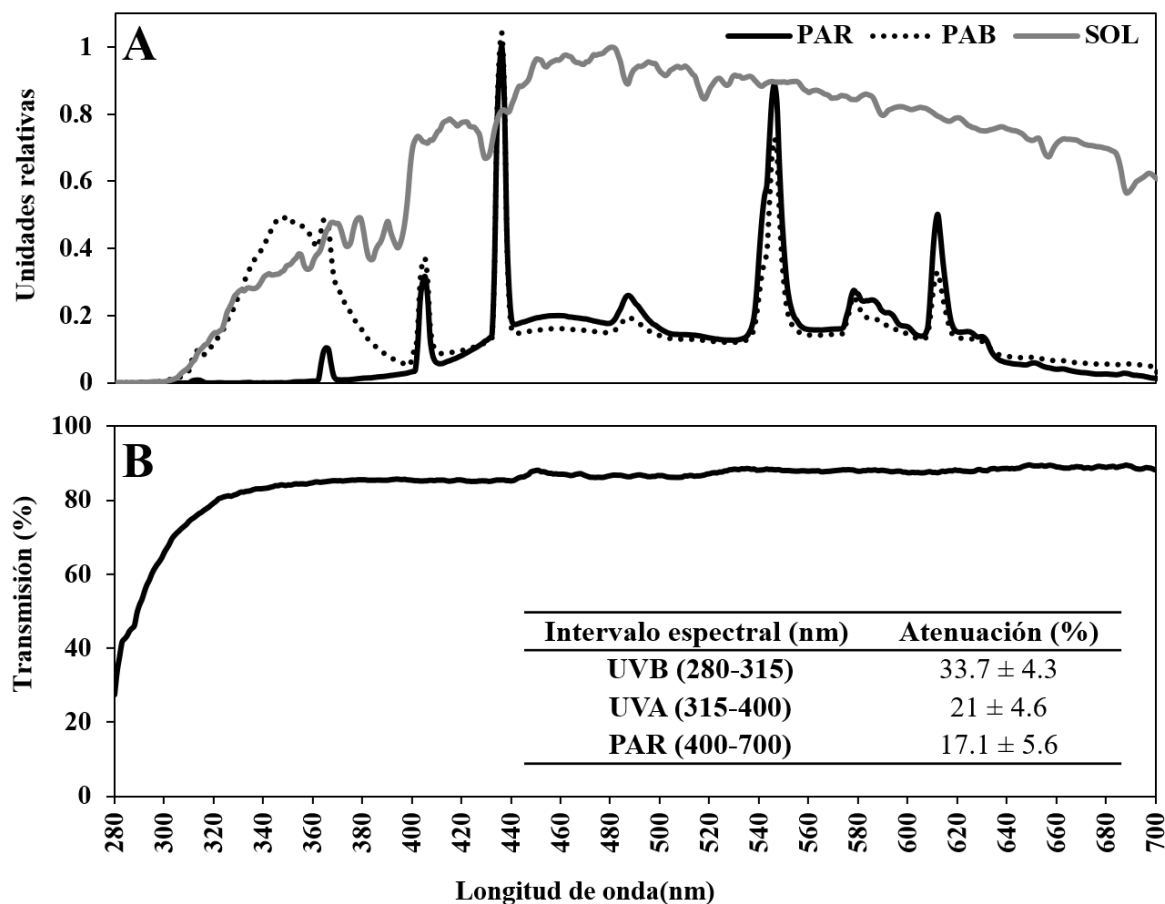


Figura M.3. Irradiancia espectral para los tratamientos espectrales PAR y PAB, expresada en unidades relativas (A), y espectro de transmisión para los cilindros en los que se cultivaron las algas (B). Los tratamientos espectrales y los cilindros fueron empleados en los **Capítulos 2 y 3** de esta Tesis Doctoral.

Tabla M.1. Irradiancias de PAB [PAR (400-700 nm) + UVB (280-315 nm) + UVA (315-400 nm)] y PAR (400-700 nm) empleadas en los **Capítulos 2 y 3** de esta Tesis Doctoral. Dosis de radiación integrada y efectos biológicos* expresados en KJ m^{-2} para los diferentes tratamientos.

	PAR	PAB
UVB (W m^{-2})	0.02	0.6
UVA (W m^{-2})	0.7	12.7
PAR ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	141	146
UVA/UVB	24.2	20.4
UVR/PAR	0.02	0.43
UVB dosis diaria integrada	14	36
UVA dosis diaria integrada	381	731
PAR dosis diaria integrada	1782	1928
Fotoinhibición de cloroplastos*	0.12	4.01
Inhibición de la fotosíntesis*	0.01	3.10
Daño en el ADN*	0.01	0.03
Peroxidación lipídica*	0.05	2.09

*Efectos biológicos citados en el epígrafe 1.2.

1.1.2. Radiación natural

La luz solar, en el más amplio sentido, es el espectro total de radiación electromagnética proveniente del Sol emitida en forma de fotones por los procesos de termonucleares que acontecen en él. Esta radiación llega a la Tierra y sufre procesos atmosféricos de filtrado modificando la forma espectral resultante (Figura M.4A). La intensidad y la distribución espectral de la radiación solar que llega a la superficie terrestre dependen de la composición de la atmósfera. A nivel de la superficie, el 6.4% de la radiación la comprende la UVR, el 48% la radiación visible (PAR) y el 45.6% la radiación infrarroja. Para el experimento desarrollado en el **Capítulo 4**, en el Banco Español de Algas, se utilizaron además de la exposición a la radiación solar natural, invernaderos fabricados con policarbonato Suntuf® para filtrar la UVR solar (Figura M.4B).

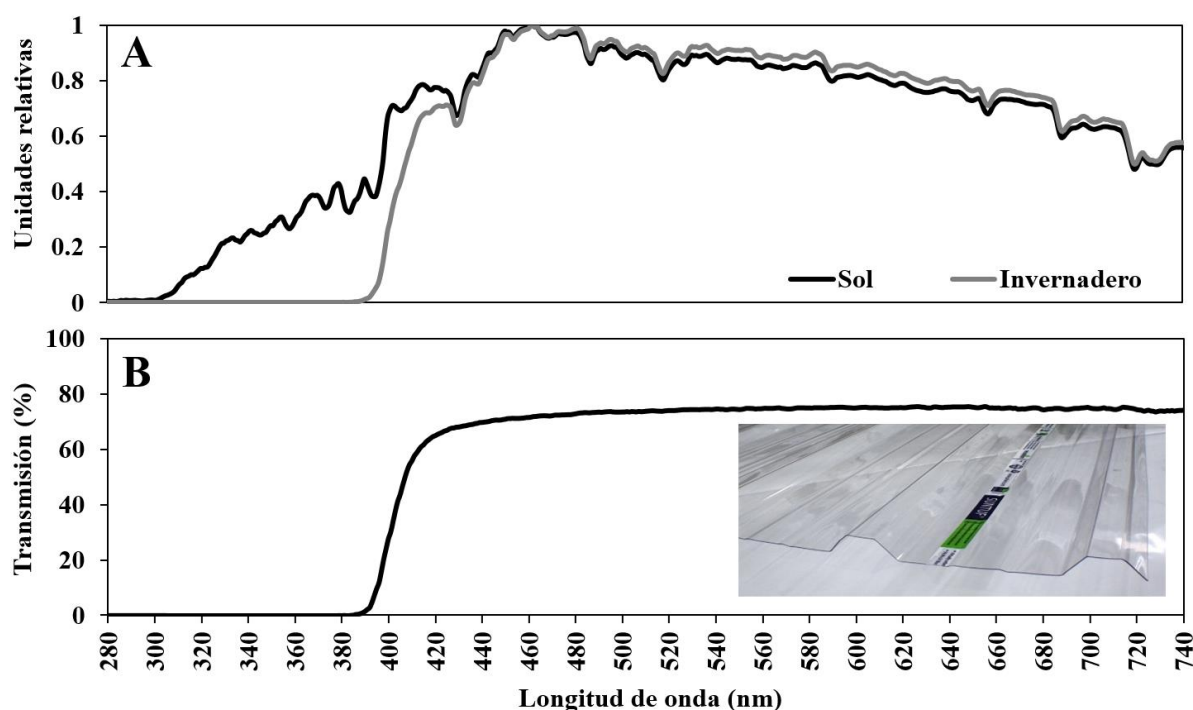


Figura M.4. Espectro solar (en negro) y espectro filtrado por invernadero (en gris) (A). El invernadero filtra el 100% de la radiación UVB, y transmite el 2.7% de la radiación UVA y el 72.3% de la radiación PAR (B).

1.2. Dosis de radiación y espectros de acción

La efectividad de un tipo de radiación en producir una respuesta biológica depende de su longitud de onda (Rundel 1983). Por lo tanto, se puede expresar el efecto de un tipo de radiación en un proceso biológico mediante una función $\varepsilon(\lambda)$ que se denomina espectro de acción o espectro biológicamente activo. Esta función se normaliza asignándole el valor de 1 a la longitud de onda de mayor efectividad. Estas funciones son de gran utilidad para realizar estudios comparativos, ya que

permite estandarizar medidas de radiación de distintas zonas geográficas o procedentes de distintas fuentes de radiación artificial.

Cuando la irradiancia espectral se multiplica por la función que representa el espectro de acción para un proceso biológico, se obtiene la irradiancia espectral biológicamente efectiva para ese proceso. Función que integrada en el tiempo da la dosis biológicamente efectiva de radiación.

$$\text{Dosis Biológica Efectiva} = \int_{t_2}^{t_1} \int_{\lambda_2}^{\lambda_1} I(\lambda) \cdot \varepsilon(\lambda) d\lambda dt$$

Donde $I(\lambda)$ es la irradiancia espectral, $\varepsilon(\lambda)$ es la efectividad biológica relativa y t es el tiempo.

En esta Tesis Doctoral, para los experimentos donde se cultivaron especies algales, se emplearon los espectros de acción para daño en el ADN, fotoinhibición de cloroplastos, inhibición de la fotosíntesis, fotoisomerización, daños generalizados y peroxidación lipídica (Jones & Kok 1966; Caldwell 1971; Setlow 1974; Gibbs et al. 1993; Morliere et al. 1995; Flint & Caldwell 2003). Se calculan las dosis biológicas efectivas en unidades de KJ m^{-2} en los **Capítulos 2 y 3**.

2. Temperatura y pH

La temperatura en los experimentos que se realizaron en los **Capítulos 2, 3 y 4**, se monitorizó en continuo usando un sensor de temperatura data logger de la marca HOBO® Water Temp Pro V2 (Figura M.5A). Los datos se extrajeron usando el software HOBOWare. El pH se midió mediante dos pH-metros ambos de la marca Crison®: portátil pH 25+ (B) y estático pH-meter Basic 20+ (Figura M.5C).



Figura M.5. Sensor de temperatura HOBO® Water Temp Pro V2 (A), pH-metro portátil pH 25+ Crison (B) y pH estático pH-meter basic 20+ Crison (C).

3. Biofiltración de nitrógeno

3.1. Cuantificación de amonio (N-NH_4^+) en agua de mar

La determinación del catión amonio (NH_4^+) en agua de mar (**Capítulo 4**) se realizó de acuerdo a Timothy et al. (1984) mediante una reacción colorimétrica. La formación del complejo coloreado (azul de indofenol) que se desarrolla por la reacción entre el amonio, hipoclorito sódico y fenol en presencia de nitroprusiato sódico dando como resultado un color azul estable (durante 24 h) el cual se determina espectrofotométricamente a 640 nm. Se realizó una recta patrón con NH_4Cl a una concentración comprendida entre 10-200 μM en matraces aforados de 50 mL.

3.2. Cálculo de la eficiencia de eliminación de amonio (NUE)

La biofiltración del N-NH_4^+ fue determinada a lo largo del experimento justo después de la recolección y ajuste de la biomasa a 9 g L^{-1} para cada uno de los tratamientos experimentales. Para ello, se tomaron alícuotas a la entrada y a la salida de los tanques de experimentación en cada uno de los tratamientos. Como control, se utilizó agua de mar natural. La eficiencia de absorción de nitrógeno (NUE) se expresó como porcentaje (%).

$$\text{NUE (\%)} = 100 - ([\text{NH}_4^+]_{\text{Salida}} \cdot 100 / [\text{NH}_4^+]_{\text{Entrada}})$$

donde: $\text{NH}_4^+_{\text{salida}}$ es la concentración (μM) de amonio a la salida y $\text{NH}_4^+_{\text{entrada}}$ es la concentración de amonio a la entrada de los tanques.

3.3. Cálculo de la tasa de asimilación de amonio (NUR)

La tasa de asimilación/incorporación/eliminación de nitrógeno (NUR) es un parámetro que proporciona información del consumo de nitrógeno por parte de los organismos biofiltrantes (en mmol de NH_4^+) en función del caudal de entrada y de la superficie del tanque de cultivo:

$$\text{NUR} = Q [(\text{NH}_4^+)_{\text{Salida}} - (\text{NH}_4^+)_{\text{entrada}}] / A$$

donde: $\text{NUR} = (\text{mmol m}^{-2} \text{ h}^{-1})$; $Q = \text{caudal volumétrico (L h}^{-1})$; $\text{NH}_4^+ = \text{concentración de amonio}$ y $A = \text{superficie del tanque de cultivo (m}^2\text{)}$.

3.4. Productividad de nitrógeno

El rendimiento de nitrógeno también es usado por numerosos autores para calcular la eliminación de nitrógeno en el medio por parte de un biofiltro (Mata et al. 2007). El cálculo es sencillo y resulta del producto de la productividad de la biomasa por el contenido de N interno.

$$\eta N = P \cdot N_c$$

donde: ηN = rendimiento de nitrógeno ($\text{mg N m}^{-2} \text{ d}^{-1}$); P = productividad de la biomasa ($\text{g PS m}^{-2} \text{ d}^{-1}$)
y N_c = nitrógeno contenido en la biomasa ($\text{mg N g}^{-1} \text{ PS}$).

4. Medios de cultivo empleados

Para el mantenimiento y crecimiento de la biomasa previo a la realización de los experimentos, se utilizó el medio Provasoli (Provasoli 1963) (Tabla M.2). A un litro de agua de mar, se añaden 20 mL del medio que se detalla a continuación, ajustando su pH a 8.2 y conservándolo una vez preparado a 4°C. Para preparar un litro de este medio de cultivo se emplean las siguientes cantidades de cada componente:

Tabla M.2. Composición del Medio Provasoli.

Agua destilada	600 mL
Tris buffer (Tris Hidroximetilaminometano)	3 g
Nitrato sódico	2.1 g
Glicerofosfato sódico	0.3 g
Yoduro potásico	1.6 mg
Óxido de germanio	0.25 g
Vitamina B ₁₂ (5 mg · 500 mL ⁻¹)	6 mL
Tiamina (100 mg · 100 mL ⁻¹)	3 mL
Biotina (5 mg · 500 mL ⁻¹)	3 mL
Solución de metales P-II	150 mL
Solución de hierro-EDTA	150 mL
Solución de metales P-II, añadir a un litro de agua destilada:	
Titriplex III (Ácido etilendiaminotetraacético disódico dihidrato)	1.10 g
Ácido bórico	1.14 g
FeCl ₃ · 6H ₂ O	0.049 g
MnSO ₄ · H ₂ O	0.124 g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.022 g
CoSO ₄ · 7H ₂ O	0.005 g
Solución de hierro-EDTA, añadir a un litro de agua destilada:	
Titriplex III (Ácido etilendiaminotetraacético disódico dihidrato)	0.726 g
Fe (NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ · 6H ₂ O	0.7 g

5. Medida de la tasa de fotosíntesis por fluorescencia *in vivo* de la clorofila asociada al fotosistema II.

En la actualidad, existen numerosas técnicas o metodologías para estimar la fotosíntesis a partir de los procesos físicos (calor, fluorescencia, etc.) o a partir de productos del metabolismo fotosintéticos (O₂, CO₂) que ocurren durante la fotosíntesis. En esta Tesis Doctoral se empleó para estimar la

fotosíntesis *in vivo* de manera rápida y no intrusiva, la técnica de la medida de fluorescencia *in vivo* de la clorofila *a* asociada al fotosistema II (PSII, del inglés *Photosystem II*). Esta técnica permite determinar, los rendimientos cuánticos, la capacidad fotosintética y la cantidad de energía que se transfiere a la cadena de transporte electrónico y la que se disipa en forma de calor durante la fotosíntesis (Schreiber et al. 1986).

La emisión de fluorescencia de la clorofila *a* se extiende entre 660 y 760 nm y fueron evaluadas mediante el uso de un fluorímetro Diving-PAM (Walz) (Figura M.6). Existen dos mecanismos que compiten durante los procesos de desexcitación, son la conversión fotoquímica de energía en los centros de reacción del PSII y los mecanismos no fotoquímicos a nivel de antena y de centros de reacción. Debido a la intervención de ambos mecanismos la eficiencia potencial de emisión de fluorescencia disminuye (Figura M.6).



Figura M.6. Uso de la energía lumínica en condiciones fisiológicas. La mayor parte de esta se usará en el proceso fotosintético, mientras que la energía que no pueda ser empleada se disipará en forma de calor o reemitida en forma de luz (fluorescencia). Esta fluorescencia se midió con un fluorímetro Diving-PAM (Walz)

A temperatura ambiente la fluorescencia variable se origina casi exclusivamente por el PSII, a una temperatura de unos 77 K se observaría fluorescencia tanto del PSII ($\lambda_{\text{máx}} = 690 \text{ nm}$) como del PSI ($\lambda_{\text{máx}} \text{ emisión} = 730 \text{ nm}$) (Björkman 1987). Cuando todos los centros de reacción están abiertos se alcanza el nivel mínimo de rendimiento fluorescente F_0 , cuando se aplica el pulso de saturación se alcanza el máximo rendimiento fluorescente F_m , en este punto están todos los centros de reacción cerrados. La diferencia entre ambos parámetros ($F_m - F_0$) se denomina fluorescencia variable F_v que indica el potencial de transporte electrónico del PSII para un estado fisiológico determinado. A la proporción entre F_v/F_m , se le denomina *rendimiento cuántico máximo*. Cuando existe una preadaptación a unas determinadas condiciones de luz la medida instantánea de fluorescencia (F_t) refleja la existencia de un número de centros de reacción reducidos por lo que la emisión máxima de

fluorescencia disminuye, reflejándose como F_m' . Así pues, se define el rendimiento cuántico efectivo de emisión de fluorescencia ($\Delta F/F_m'$), siendo ($\Delta F = F_m' - F_t$) análogo a F_v/F_m pero para organismos aclimatados a condiciones de luz como:

$$\Delta F / F_m' = Y(II) = (F_m' - F_t) / F_m'$$

Para determinar el rendimiento máximo de fluorescencia de clorofila del PSII (F_v/F_m), las muestras de algas fueron incubadas por 15 min en oscuridad (Schreiber et al. 1986; Schreiber & Bilger 1993; Schreiber et al. 1994; Figueroa et al. 2003; Figueroa et al. 2014). Tras este período de incubación lo suficientemente largo como para establecer un estado estacionario reproducible en el que se asume que todos los centros de reacción están oxidados o abiertos, el pool de plastoquinonas está oxidado y las ATPasas y los enzimas del ciclo de Calvin inactivas (Schreiber et al. 2003).

Esta medida indica la eficiencia máxima en los procesos de conversión de energía fotoquímica de un organismo fotosintético adaptado a oscuridad, es decir, la máxima capacidad fotosintética o de aprovechamiento energía lumínica. La fluorescencia basal (F_o) se midió tras el encendido de la luz de medida y tras el pulso de saturación de $4000-5000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y de una duración de 800 ms se obtiene la fluorescencia máxima (F_m). F_v es $F_m - F_o$ y la proporción de F_v/F_m es el rendimiento máximo. Este parámetro es un buen indicador de la eficiencia fotosintética máxima del organismo fotosintético en cuestión (Genty et al. 1989).

5.1. Tasa de transporte de electrónico (ETR, Electron Transport Rate).

Representa una estimación del tránsito electrónico a través de la cadena de transporte electrónico (Genty et al. 1989). Su cálculo está basado en la determinación del rendimiento cuántico efectivo de emisión de fluorescencia y en los valores de irradiancia incidente (E) sobre la muestra empleando la siguiente ecuación:

$$\text{ETR} = \Delta F/F_m' \cdot E \cdot A \cdot FII (\mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1})$$

donde, $\Delta F/F_m'$ es el rendimiento efectivo del PSII a una determinada irradiancia PAR incidente (E), A es la absorptancia la cual se define como $1-T-R$, siendo T la transmitancia (fracción de la irradiancia incidente que es transmitida a través del tejido) y R la reflectancia. Por último FII es la fracción de clorofila asociada al Fotosistema II (PSII), en general en algas rojas se considera 0.15, en algas verdes 0.5 y en algas pardas 0.8 (Grzyski et al. 1997; Figueroa et al. 2014). Esta variable puede ser ligeramente diferente dependiendo de la irradiancia o dosis que reciba el organismo fotosintético a estudiar (Suggett et al. 2004; Johnsen & Sakshaug 2007).

La irradiancia incidente (E) procede de la lámpara halógena del DIVING-PAM con 12 niveles de intensidad expresada en μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (1 = 12.3; 2 = 49.8; 3 = 88.6; 4 = 162.6; 5 = 220.1; 6 = 317.5; 7 = 423.6; 8 = 591; 9 = 864; 10 = 1281; 11 = 1854; 12 = 2962) incubando 20 segundos en cada uno de ellos, o bien de una fuente externa de luz no asociada a ninguno de los fluorímetros. A partir de estas incubaciones, se produce una variación de la respuesta de ETR o Y(II) a cada cantidad de luz, lo cual permitirá construir la curva fotosintética-irradiancia o curva rápida de luz (RLC).

5.2. Curvas Rápidas de Luz (RLC)

A partir del modelo matemático tangencial fotosíntesis-irradiancia (F/I) propuesto por Eilers and Peters (1988), se calcularon, mediante ajuste matemático de la curva, los parámetros fundamentales a, b y c (Figura M.7):

$$F = \frac{I}{aI^2 + bI + c}$$

La producción fotosintética máxima (ETR_{max}), definida como la capacidad máxima de transporte de electrones, se obtuvo a partir de los parámetros anteriores:

$$\text{ETR}_{\text{max}} = \frac{1}{b + 2\sqrt{ac}}$$

Se determinó también la eficiencia fotosintética (α_{ETR}) como la pendiente de la función tangencial F/I:

$$\alpha_{\text{ETR}} = \frac{1}{c}$$

La irradiancia de saturación de la fotosíntesis ($E_{k_{\text{ETR}}}$):

$$E_{k_{\text{ETR}}} = \frac{c}{b + 2\sqrt{ac}}$$

Por último, se calcula la irradiancia óptima (I_m), en la cual, la fotoinhibición es inhibida en un 26% de acuerdo a Ritchie (2008):

$$I_m = \sqrt{\frac{c}{a}}$$

Cabe destacar que cuando la extensión de la fase de saturación es grande, la I_m y la $E_{k_{\text{ETR}}}$, están más distanciadas

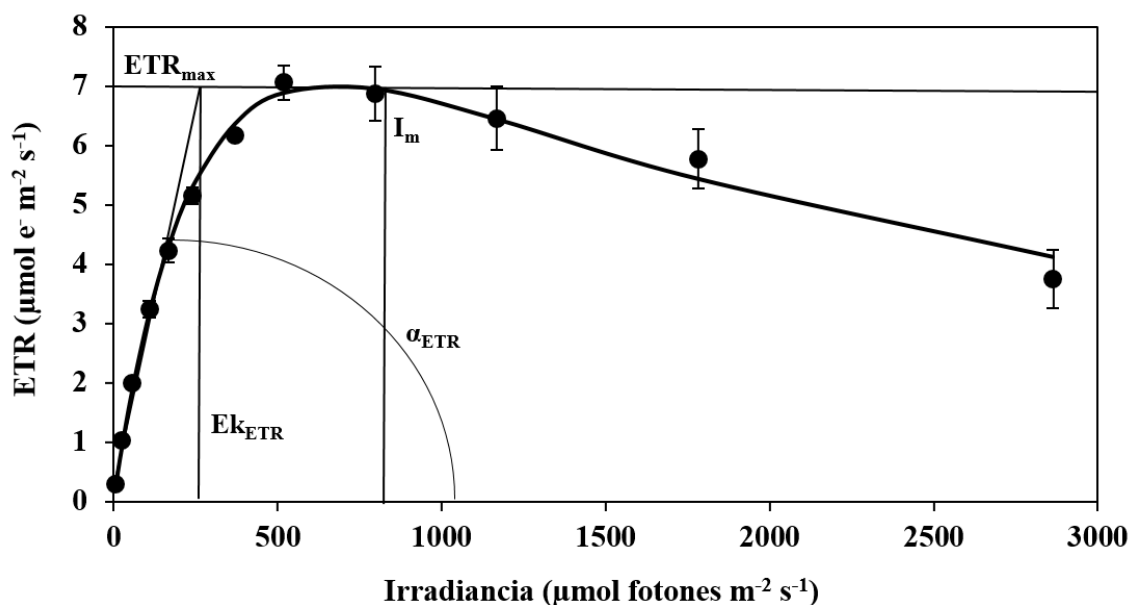


Figura M.7. Ejemplo de una RLC de *Hydropuntia cornea* (**Capítulo. 4**) a partir de la cual, se calculan los diferentes parámetros fotosintéticos. α es la eficiencia fotosintética (calculada por la tangente desde el ángulo α), ETR_{max} es la tasa de transporte electrónico máxima, E_k es la irradiancia de saturación y I_m es la irradiancia óptima.

5.3. Amortiguamiento no fotoquímico (NPQ)

El amortiguamiento no fotoquímico (NPQ) se calculó de acuerdo a Schreiber et al. (1995) como:

$$NPQ = (F_m - F_m') / F_m'$$

El NPQ máximo (NPQ_{max}) y la pendiente inicial de NPQ frente a la función de irradiancia (α_{NPQ}) se obtuvieron de la función tangencial de NPQ frente a la irradiancia de acuerdo con Eilers y Peeters (1988a). Por último, la irradiancia de saturación para NPQ ($E_{k_{NPQ}}$) se calculó a partir de la intersección entre NPQ_{max} y α_{NPQ} .

5.4. Rendimientos fotosintéticos

El cálculo de los parámetros para los rendimientos fotosintéticos se hizo de acuerdo a los procedimientos matemáticos descritos por Klughammer & Schreiber (2008). Estos rendimientos cuánticos describen exhaustivamente el destino de la energía de excitación en el PSII y permiten una comprensión profunda de la capacidad del organismo fotosintético para hacer frente al exceso de energía de excitación o de conversión fotoquímica en el PSII. Los parámetros de los rendimientos fotosintéticos son tres: el rendimiento efectivo o de conversión fotoquímica en el PSII: **Y(II)**;

rendimiento de la pérdida de energía no fotoquímica y no regulada en el PSII $Y(NO)$ y rendimiento de la pérdida de energía no fotoquímica regulada en el PSII $Y(NPQ)$. La suma de los tres parámetros siempre es 1:

$$Y(II) + Y(NPQ) + Y(NO) = 1$$

donde: $Y(II)$ es $F_m' - F'/F_m'$; $Y(NO)$ es F'/F_m' y $Y(NPQ)$ es $F'/F_m' - F'/F_m$.

5.5. ETR como estimador de la productividad de la biomasa

Para el **Capítulo 4**, se estimó la productividad de la biomasa ($g\ PS\ m^{-2}\ d^{-1}$) a partir del ETR ($\mu mol\ e^{-}\ s^{-1}$) de acuerdo a la metodología empleada por (Jerez et al. 2016). El valor de ETR empleado fue el valor máximo de ETR (ETR_{max}) calculado a partir de la monitorización en un ciclo diario completo para la primera y última semana del experimento. Para ello, es necesario calcular previamente la producción de carbono ($mol\ C\ m^{-2}\ d^{-1}$) a partir de dicho ETR cuyo cálculo emplea el requerimiento cuántico (QR; del inglés *Quantum requirement*), siendo este parámetro el número de mol de fotones necesarios para producir un mol de oxígeno (Kromkamp et al. 2008). De acuerdo a Figueroa et al. (2003a), se consideró el valor teórico de 1/8 para el requerimiento cuántico, lo cual significa que se necesitan 8 fotones (absorbidos) tanto por el PSI y PSII, para producir una molécula de oxígeno. Se asumió además un valor teórico de 1.2 para la eficiencia fotosintética (PQ; del inglés *Photosynthetic quotient*). Este PQ indica la cantidad de moles de O_2 necesarios para fijar un mol de C. Este valor de PQ depende de la fuente de nitrógeno, siendo 1.1-1.2 para NH_4^+ (Laws 1991). La siguiente ecuación quedaría como:

$$\text{Producción de Carbono (mol C m}^{-2}\text{ d}^{-1}\text{)} = ETR_a \cdot QR \cdot PQ^{-1}$$

La productividad de biomasa para los cultivos macroalgales se expresa habitualmente por unidad de área ($g\ PS\ m^{-2}\ d^{-1}$). De acuerdo con esto, se estimó la productividad de la biomasa (en adelante eBP; del inglés *estimated Biomass Productivity*) considerando el contenido interno de carbono.

$$eBP\ (g\ PS\ m^{-2}\ d^{-1}) = Pc \cdot (Mc / C)$$

donde Pc es la productividad de carbono fotosintético, Mc es la masa molar de C ($12\ g\ mol^{-1}$) y C es el contenido de carbono total contenido en la biomasa en $mg\ g^{-1}\ PS$.

6. Relación Peso fresco / Peso seco (PF/PS), cenizas y materia orgánica

Se tomaron muestras para cada una de las especies (diferentes pesos para cada una de ellas con el fin de poder estimar la relación a partir de una recta) ($n=10$) y se determinaron los pesos frescos (PF) empleando una balanza de precisión. El peso seco (PS) se determinó después de mantener las muestras durante 24 h a una temperatura de 60 °C (Figura M.8A) en una estufa VENTI-LINE (VWR®) de acuerdo al metodología descrita por Peckol & Rivers (1996). El contenido de materia orgánica (%) y posteriores cenizas resultantes, se estimó midiendo la pérdida de material por ignición a 550°C en un horno de combustión Nabertherm (Model L5/11) durante 3.5 h (Figura M.8B).



Figura M.8. Determinación de la relación PF/PS en estufa VENTI-Line (VWR) (A) y determinación del contenido de materia orgánica y cenizas por ignición en horno de combustión (Nabertherm, Modelo L5/11) (B).

7. Tasa de crecimiento y producción

La tasa de crecimiento se calcula a partir del incremento de peso fresco con respecto al tiempo. Los cálculos para la tasa de crecimiento se realizaron de acuerdo a D'Elia & DeBoer (1978).

$$\mu = [100 \cdot \ln (W_t / W_o)] / t$$

donde: μ = crecimiento diario en porcentaje; W_t = biomasa el día t y W_o = biomasa inicial.

La producción de biomasa (mBP; del inglés *measured Biomass Productivity*) se calculó acorde a DeBoer & Ryther (1977):

$$\text{mBP} = (N_t - N_o) / (t \cdot A)$$

donde: mBP = productividad en g PS · m⁻² · d⁻¹; N_t = biomasa el día t; N_o = biomasa inicial; A = área superficial del tanque de cultivo (m²).

8. Biovolumen

Las dimensiones geométricas de los talos centrales (primera ramificación) de *Hydropuntia cornea* (**Capítulo 4**), se calcularon de acuerdo a las fórmulas geométricas de un cilindro elipsoidal mediante observación al microscopio óptico.

La ecuación de una elipse es:

$$(x^2 / a^2) + (y^2 / b^2) = 1$$

La excentricidad de la elipse se define con la letra “e”. A esta integral se la denomina integral elíptica completa de segunda especie.

$$e = c / a$$

“c” es la semidistancia focal y queda definida cómo:

$$c = \sqrt{a^2 - b^2}$$

Una fórmula aproximada de la longitud de la elipse (L) sería:

$$L \approx \pi (3(a + b) - \sqrt{(3a + b)(a + 3b)})$$

La superficie o área de base de un cilindro elíptico es:

$$A_{\text{base}} = \pi \cdot a \cdot b$$

La superficie o área lateral de un cilindro elíptico es:

$$A_{\text{lateral}} = L \cdot h$$

La superficie total (S) de un cilindro elíptico es:

$$S_{\text{total}} = (2 \cdot A_{\text{base}}) \cdot (A_{\text{lateral}})$$

Y el volumen de un cilindro elíptico sería:

$$V = S \cdot h$$

donde: h es la altura del cilindro la cual es considerada como 1.

9. Microscopía

9.1. Microscopía óptica

El microscopio óptico (LM del inglés, *Light Microscopy*) es un elemento esencial para los estudios generales de histología puesto que nos permite observar las diferentes características morfológicas de las células y los tejidos en algas. Se basa en el uso de lentes para aumentar los rayos de luz que atraviesan una muestra de tejido. En el **Capítulo 3** de este trabajo, se utilizó un microscopio de epifluorescencia (Olympus BX 41) equipado con el software de imagen Q Capture Pro 5.1 (Qimaging Corporation, Austin, TX, EE.UU.) ubicado en la Universidade Federal de Santa Catarina (Brasil).

9.1.1. Tinción PAS

La técnica de PAS (ácido peryódico-Schiff) es y ha sido utilizada durante mucho tiempo por numerosos investigadores como método para la identificación de macromoléculas que presentan hidratos de carbono en su estructura. Aun así, la reacción PAS positiva puede deberse a la presencia de otras moléculas muy diferentes a los hidratos de carbono. Por lo tanto, según Pearse (1985) la especificidad del PAS para la detección de hidratos de carbono no puede ser aceptada sin una cualificación a posteriori. Los hidroxilos libres de dos átomos de carbono adyacentes (como los grupos 1,2-glicol de las hexosas) de macromoléculas tisulares pueden ser visualizadas histoquímicamente mediante la oxidación a dialdehídos (con el ácido peryódico) y posterior condensación de los grupos aldehídos con agentes cromogénicos como el reactivo de Schiff (Spicer 1961; 1962). Los grupos hidroxilos adyacentes visualizados por el PAS, están presentes principalmente pero no exclusivamente en residuos de carbohidratos. Los azúcares pequeños son solubles y, por lo tanto, no resisten los diferentes lavados durante el procedimiento.

9.1.2. Tinción TB-O

La tinción con azul de toluidina (TB-O), es una tinción policromática para paredes celulares. La solución de azul de toluidina se utiliza para demostrar la presencia de celulosa y demás moléculas de naturaleza estructural (O'Brien et al. 1964). Para las dos tinciones que se emplearon en esta Tesis Doctoral (**Capítulo 3**), las muestras de aproximadamente 5 μm se fijaron en 2.5% de paraformaldehído, en tampón fosfato (PBS: 0.1 M, pH 7.2) durante toda la noche de acuerdo a la metodología empleada por Schmidt et al. (2009). Posteriormente, las muestras se deshidrataron siguiendo una serie de soluciones acuosas de etanol en aumento creciente de concentración. A continuación se infiltraron con Histoiresina (Leica Histoiresin, Heidelberg, Alemania). Después de esta etapa, se tiñeron con 0.5% azul de toluidina (TB-O), pH 3.0 (Merck Darmstadt, Alemania), y por último se tiñeron con ácido periódico de Schiff (PAS) que se utiliza para identificar polisacáridos neutros como se describe por Schmidt et al. (2012).

9.2. Microscopía electrónica de transmisión

El empleo del microscopio electrónico de transmisión (TEM del inglés, *Transmission Electron Microscopy*) permite obtener imágenes celulares con gran detalle a nivel ultraestructural. Esta técnica de visualización posee una gran potencia amplificadora, permitiendo visualizar y obtener fotografías de entre 10 a 200.000 aumentos frente a los 550 de la microscopía óptica convencional.

9.2.1. Preparación de las muestras

La técnica de preparación de muestras para su observación al microscopio electrónico de transmisión puede ser dividida en varios pasos: fijación, deshidratación, infiltración e inclusión, corte y observación. Este proceso se inicia con la muestra hidratada y finaliza cuando la misma, libre de agua y preservada, es inmersa en una matriz de resina plástica donde puede ser preservada por mucho tiempo. Esta penetra al interior de la célula sustituyendo al agua y le confiere suficiente firmeza para hacer posible la obtención de secciones o cortes de en 50 a 120 nm. Los cortes obtenidos son posteriormente contrastados y observados al TEM. Posteriormente, los talos se someten al proceso de “fijación” en una solución de paraformaldehído 3% en PBS 0.1 M (pH 7.2) durante 12 h en frío. Pasado este tiempo, las muestras son sometidas a varios lavados (3x 20 min) únicamente con PBS 0.1 M (pH 7.2) y se someten al proceso de “postfijación” mediante el empleo de tetróxido de osmio (OsO_4) al 2-4% con la finalidad de añadir densidad y contraste al tejido (Bozzola & Russell 1992). Después, las muestras se someten a un proceso de “deshidratación” para sustituir el agua en el material biológico por un líquido que actúe como solvente entre el medio celular acuoso y la resina de inclusión (hidrofóbica). Con este paso, se pretende lograr el reemplazo del medio acuoso utilizando una serie de concentraciones ascendentes de etanol (agente deshidratante) previo paso para la etapa de “inclusión”. Durante la “inclusión”, el tejido es endurecido mediante infiltración de sustancias

polimerizantes que solidifiquen en su interior sin afectar a las características del mismo para obtener “bloques”. Con ello se consigue obtener cortes del orden de μm a nm , según el medio de inclusión, sin que el tejido se rompa o se deteriore. Además, es un buen método para preservar las muestras durante largos periodos de tiempo donde se utilizó la resina Spurr preparándose de acuerdo a Spurr (1969).

Posteriormente, los bloques solidificados se someten a ultramicrotomía. Mediante este procedimiento, se obtienen secciones ultrafinas a partir de las muestras incluidas/confinadas en los bloques (Figura M.9). Para obtener los cortes ultrafinos se realizaron una serie de operaciones usando el ultramicrotomo que permite obtener cortes con un grosor de entre $0.1\text{-}0.5\ \mu\text{m}$.

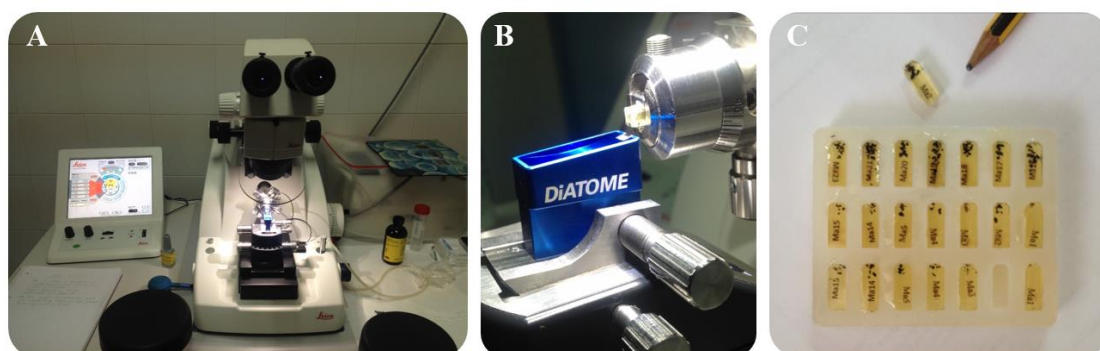


Figura M.9. Ultramicrotomo LEICA EM UC7 (1) ubicado en el Servicio de Microscopía (SCAI); corte ultrafino ($50\text{-}90\ \text{nm}$) (2) en cuchilla de diamante (DiATOME); Muestras incluidas en una matriz de resina Spurr.

Una vez obtenidos los cortes mediante ultramicrotomía, se efectuó la “contrastación”. Esta fase consiste en conferir contraste a los cortes obtenidos. Para eso se utilizan soluciones de sales de metales pesados: citrato de plomo ($\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{Pb}_3\text{O}_{14}$) y acetato de uranilo ($\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO}) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), los cuales contienen iones de alto número atómico, es decir, con un importante número de electrones y protones capaces de desviar el haz de electrones incidentes sobre la muestra. Para preparar la solución saturada de acetato de uranilo, se añadió una cantidad de esta sal, a $50\ \text{mL}$ de EtOH (70%) y se agitó vigorosamente durante 30 segundos. Se dejó reposar la solución por $1\ \text{h}$ antes de su uso y se guardó a temperatura ambiente y en oscuridad. La solución de citrato de plomo se preparó añadiendo $4\ \text{g}$ de citrato de plomo y $5.3\ \text{g}$ de citrato trisódico a $90\ \text{mL}$ de agua bidestilada. Luego se añadieron $25\ \text{mL}$ de hidróxido de sodio (NaOH) 1N y se completó el volumen con agua bidestilada hasta un volumen final de $150\ \text{mL}$. Posteriormente, ambas soluciones son filtradas usando filtros Whatman N°5 ($2.5\ \mu\text{m}$). Por último, para realizar la contrastación, se colocan las rejillas (con los cortes hacia abajo) y se van agregando gotas de ambas soluciones. Se mantienen por $10\ \text{min}$ a temperatura ambiente, para finalmente lavar con abundante agua destilada.

9.2.2. Observación de los cortes

A diferencia del microscopio óptico, el mecanismo de visualización de la muestra, se basa en el empleo de un haz de electrones incidente que atraviesa la muestra ultrafina, obteniéndose información ultraestructural de la muestra según las pérdidas específicas de los diferentes electrones del haz. Las muestras previamente preparadas, fueron observadas en el microscopio electrónico de transmisión JEOL-JEM 1400 (USA) ubicado en los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Málaga (Figura M.10). Dicho microscopio está provisto de una cámara de alta resolución Gatan ES1000W, con una resolución de 11 megapíxeles y montaje lateral elevado la cual permite obtener imágenes con gran amplitud de campo y excelente nitidez. Mediante este equipo, la sombra de los detalles finos y de la ultraestructura es proyectada sobre una pantalla fluorescente formando una imagen visible o sobre una placa fotográfica registrándose la imagen en formato de altísima calidad y resolución. Para la observación y tratamiento de los cortes, se empleó el software DigitalMicrograph® V.3.4, el cual se encarga de sacar todo el partido a la cámara con funciones clásicas y avanzadas de control y tratamiento de las imágenes.

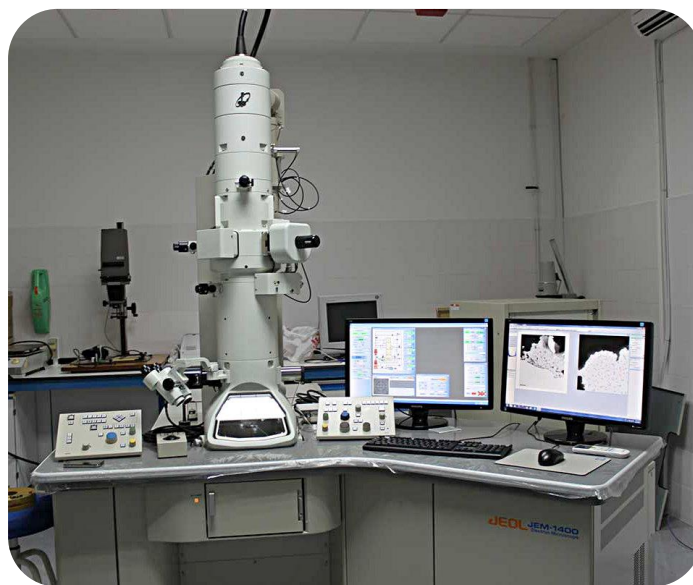


Figura M.10. Microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM-1400 de hasta 120 kV con cámara de alta resolución Gatan ES1000W.

10. Cuantificación de pigmentos

10.1. Clorofilas y carotenoides

La clorofila *a* y los carotenoides totales se extrajeron mediante disolventes orgánicos. Se empleó el método y las ecuaciones cromáticas de Wellburn (1994). Se emplearon de entre 15-20 mg

de peso fresco del alga por réplica. Las muestras se trituraron en un mortero colocado sobre una base de hielo para mantener la temperatura alrededor de 4°C al igual que para la extracción de clorofilas y carotenoides. Para cada uno de los análisis, se añadió a la muestra entre 1.5-2 mL de metanol 100% y se trituró con la ayuda de un mortero y mediante el empleo de arena de mar como agente abrasante. Los extractos se transfirieron a tubos de 1.5 mL y se sometieron a centrifugación por 10 min a 5000 g. Por último, se determinó las densidades ópticas para el cálculo de la concentración empleando un espectrofotómetro UVMMini-1240 (modelo Shimadzu, Columbia, USA). La ecuación para el cálculo de la concentración de clorofila *a* fue la siguiente:

$$\text{Chl } a = (16.72 \cdot A_{665.2})$$

donde: Chl *a* = concentración de clorofila ($\mu\text{g mL}^{-1}$) *a* y A_{λ} = absorbancia a dichas longitudes de onda (λ nm). A cada una de las absorbancias, se le restó la absorbancia medida a 750 nm, la cual corrige la turbidez de la muestra. La ecuación para el cálculo de la concentración de carotenoides totales fue la siguiente:

$$C_{x+c} = [(1000 \cdot A_{470}) - (1.63 \cdot \text{Chl } a)] / 221$$

donde: C_{x+c} = carotenoides totales ($\mu\text{g mL}^{-1}$) y *A* = absorbancia a dichas longitudes de onda (λ nm). A cada una de las absorbancias, se le restó la absorbancia medida a 750 nm, la cual corrige la turbidez de la muestra. Para expresarlo en mg de clorofila o carotenoides por gramo de peso seco, se multiplicó por el volumen de extracción y se dividió por el peso seco de la muestra analizada a partir de la relación PF/PS.

10.2. Ficobiliproteínas

Las ficobiliproteínas se pueden extraer totalmente debido a los enlaces covalentes que se establecen entre los cromóforos y la fracción apoproteica del pigmento. Las muestras (de entre 20-50 mg) se trituraron en un mortero colocado sobre una base de hielo para mantener la temperatura alrededor de 4°C al igual que para la extracción de clorofilas y carotenoides, y se añadieron 2 mL de PBS 0.1M (pH = 6.5). Posteriormente se centrifugó el extracto hidrosoluble durante 15 min a 4°C y a 10.000 g. Este extracto se empleó para cuantificar las ficobiliproteínas y también las proteínas solubles. El contenido de ficobiliproteínas se determinó según Kursar et al. (1983):

$$\text{FC} = (151.1 \cdot A_{614}) - (99.1 \cdot A_{651})$$

$$\text{FE} = (155.8 \cdot A_{498.5}) - (40.0 \cdot A_{614}) - (10.5 \cdot A_{651})$$

donde: FC y FE son ficocianina y ficoeritrina respectivamente ($\mu\text{g mL}^{-1}$) y A es la absorbancia o densidad óptica a dichas longitudes de onda (λ nm). A cada una de las absorbancias, se le restó la absorbancia medida a 750 nm, la cual corrige la turbidez de la muestra. Para expresarlo en mg de ficobiliproteínas por gramo de peso seco, se multiplicó por el volumen de extracción y se dividió por el peso seco de la muestra analizada a partir de la relación PF/PS.

11. Análisis elemental

El análisis elemental es una técnica que proporciona el contenido total de carbono y nitrógeno presente en un amplio rango de muestras de naturaleza orgánica e inorgánica tanto sólidas como líquidas. Para ello, se utilizó un analizador elemental LECO CHNS 932 ubicado en los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Málaga (Figura M.11). La técnica está basada en la completa e instantánea oxidación de la muestra mediante una combustión con oxígeno puro a una temperatura aproximada de 1000°C. Los diferentes productos de combustión CO_2 , y N_2 , son transportados mediante el gas portador (He) a través de un tubo de reducción y después selectivamente separados en columnas específicas para ser luego desorbidos térmicamente. Finalmente, los gases pasan de forma separada por un detector de conductividad térmica que proporciona una señal proporcional a la concentración de cada uno de los componentes individuales. Se utilizó como patrón EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), molécula cuyo contenido en carbono y nitrógeno (%) es bien conocido.



Figura M.11. Analizador elemental LECO CHNS 932 ubicado en las instalaciones de los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación (SCAI) en la Universidad de Málaga.

12. Cuantificación de las principales macromoléculas

12.1. Proteínas solubles

Las proteínas solubles se determinaron de acuerdo a Bradford (1976) a partir del sobrenadante del extracto preparado para la extracción y cuantificación de ficobiliproteínas. Para la cuantificación del contenido en proteínas solubles se empleó el reactivo Bio-rad® (Bio-Rad Protein Assay, GmbH, Alemania). Este método se basa en que la unión a proteínas provoca un cambio en el máximo de absorción para una solución ácida de Coomassie Brilliant Blue G-250 desde 465 nm a 595 nm (Figura M.12). Para la cuantificación de las proteínas solubles, se añadieron 50 μL del extracto a 750 μL del tampón de extracción, la reacción comienza tras completar 1 mL de reacción con 200 μL de reactivo Bio-rad®. Tras agitar las muestras se mantuvieron durante 15 min a temperatura ambiente y transcurrido este tiempo se determinó la absorbancia a 595 nm. Para la elaboración de la recta patrón, se empleó albúmina bovina en un rango de concentraciones de 0 a 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Esta recta patrón se hace a partir de un stock de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

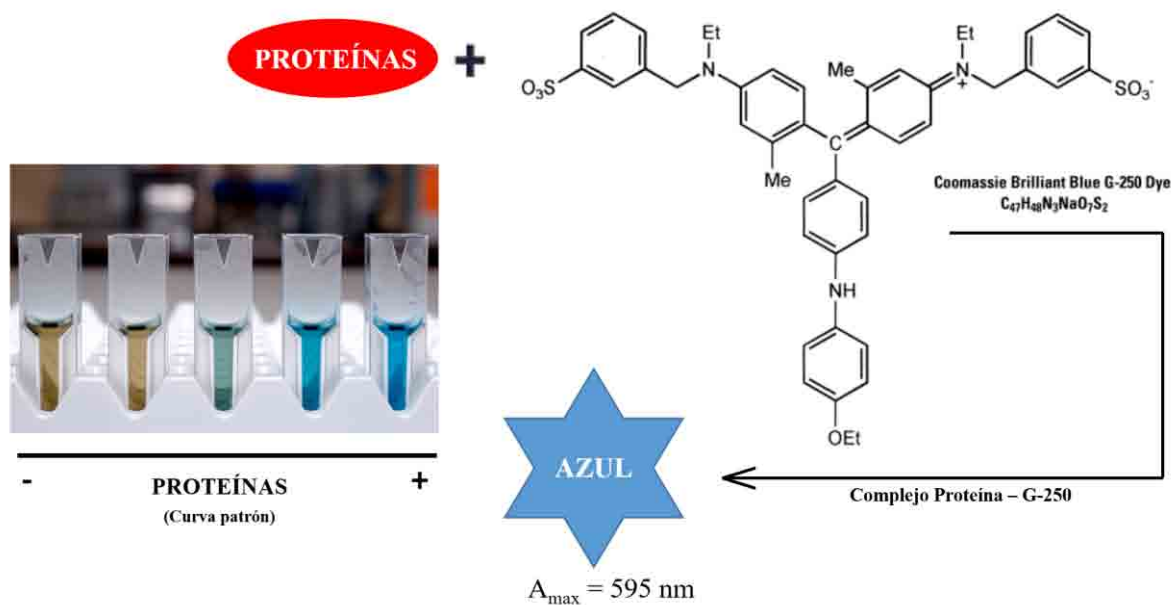


Figura M.12. Reacción colorimétrica entre las proteínas contenidas en el extracto y el reactivo Bradford para dar el complejo azul (proteína + reactivo Bio-rad®).

12.2. Carbohidratos totales

La cuantificación de carbohidratos se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Brooks et al. (1986). Se pesaron de entre 50-100 mg de liofilizado o 200 mg de peso fresco. El reactivo de antrona se preparó disolviendo 0.2 g de antrona en 100 mL de H_2SO_4 . A 50 μL de extracto, se añadieron 2 mL de reactivo de antrona y se agitó vigorosamente durante 20 s (Figura M.13). Se dejó enfriar en un baño de agua fría durante 2 min y posteriormente se incubaron las muestras a 100° C en un baño

termostatzado durante 10 min. La absorbancia se midió a 625 nm. Para obtener la recta patrón se empleó D-glucosa como patrón en concentraciones de 10 a 100 mg L⁻¹. El resultado se expresó como almidón equivalente (% de almidón) multiplicando por el factor de 0.9 de acuerdo a Bharath Kumar & Prabhasankar (2015).

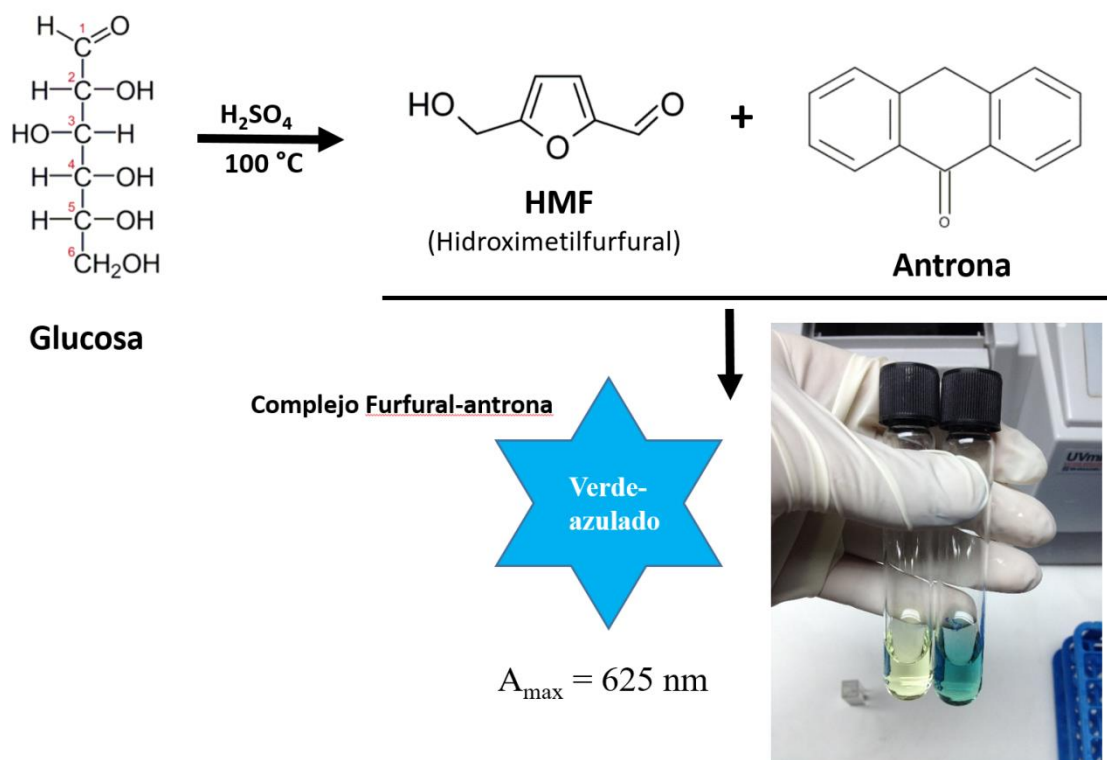


Figura M.13. Mecanismo de reacción entre el reactivo de antrona y el extracto algal (previa termohidrólisis ácida) para dar el complejo verde-azulado.

12.3. Lípidos

12.3.1. Método espectrofotométrico (SPV)

Para la cuantificación de lípidos totales en todos los capítulos de esta tesis, se empleó el método fotocolorimétrico de la Sulfo-Fosfo-Vainillina (SPV) de acuerdo a Mishra et al. (2014). Los lípidos reaccionan con el ácido sulfúrico a altas temperaturas para la formación de iones carbonilo (Figura M.14). En una segunda etapa, éstos, en presencia de fosfovainillina dan una coloración rosada. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de lípidos totales presente en la muestra ensayada (Cottet 1965; Kaplan & Glucose 1984). Para ello, se preparó el reactivo fosfovainillina disolviendo 0.6 g de vainillina en 100 mL de H₂O_d (reactivo PV) y se completó con ácido fosfórico (H₃PO₄) hasta 500 mL de volumen total. Posteriormente, se tomaron 50 µL de muestra (100 mg de biomasa algal extraídos en 1 mL de cloroformo:metanol; 2:1), y se adicionó un 1 mL H₂SO₄. Hecho esto, las muestras fueron incubadas por 30 min a 100 °C en un baño termostatzado.

Cuando las muestras se enfriaron, se añadieron 2 mL del reactivo PV. Por último, la absorbancia se midió a 625 nm. Para obtener la curva de calibrado, se utilizó como patrón trioleína, un triglicérido derivado del glicerol a unas concentraciones de entre 0.1-0.6 mg L⁻¹.

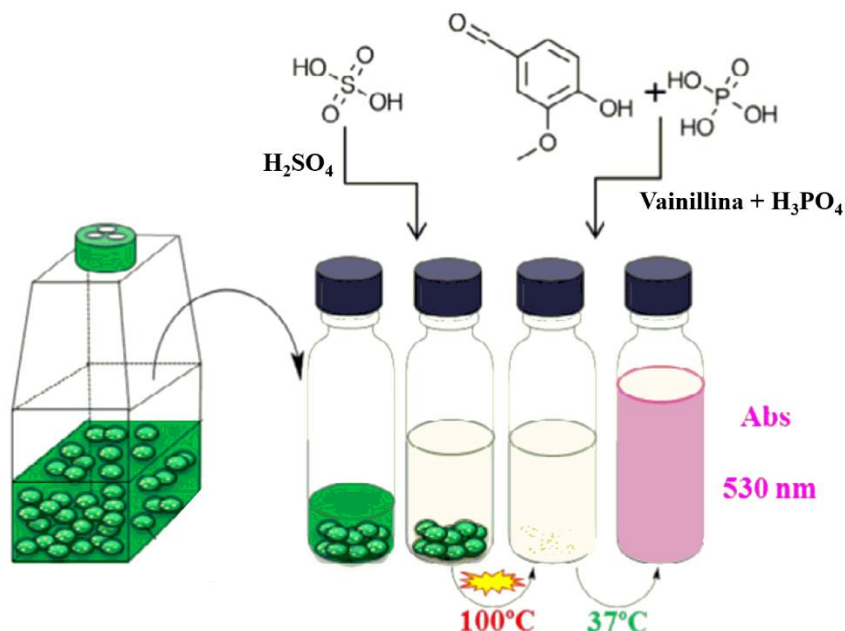


Figura M.14. Pasos para la cuantificación de lípidos totales mediante el método fotocolorimétrico (SPV). Adaptado de Mishra et al. (2014).

12.3.2. Método gravimétrico

Para el **Capítulo 4**, donde se planteó el análisis de ácidos grasos en *Hydropuntia cornea* sometida a diferentes tratamientos, se utilizó el método gravimétrico para la determinación de lípidos totales de acuerdo a Folch et al. (1957), ya que, para cuantificar mediante cromatografía de gases estos ácidos grasos, los lípidos tienen que ser primeramente extraídos gravimétricamente y posteriormente, transesterificados. Para ello, se pesan entre 50-200 mg de biomasa colocados en tubos de vidrio y se añaden 5 mL de cloroformo: metanol (2:1) con 0.01% BHT (butilhidroxitolueno) como agente antioxidante para evitar la oxidación de los lípidos durante todo el proceso. Posteriormente, se homogeniza la biomasa en el solvente mediante un dispersor ultra-turrax (T10, Ika Works Inc., USA), durante 5 min en frío. Una vez realizado este paso, se añaden a cada muestra 2 mL de KCl al 0.88 % (m/v) para conseguir la separación de fases (Figura M.15A). Para lograr esto, es necesario someter las muestras a centrifugación durante 5 min (2000 rpm). Las fases resultantes son dos: una parte superior (sales + metanol) y una parte inferior (lípidos + cloroformo). Finalmente, las muestras se someten a filtración haciendo uso de embudos de cristal y papel de filtro (Figura M.15B). Después las muestras se enfrían a -20°C durante 20 min para eliminar la capa de sal que se forma. El cloroformo donde los lípidos se encuentran disueltos se evapora con ayuda de N_2 . El cálculo de contenido de lípidos en la

muestra es un rendimiento y se calcula en porcentaje de lípidos con respecto a la biomasa seca de partida:

$$\text{Lípidos (\%)} = [\text{Lípidos (g)} / \text{Biomasa (g PS)}] * 100$$

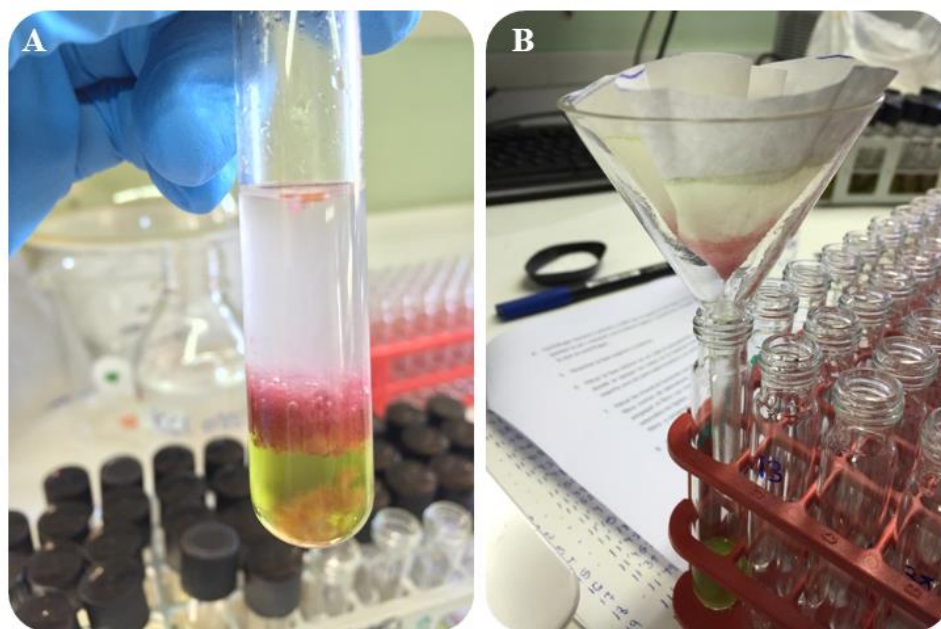


Figura M.15. Adición de KCl para la separación de fases (A) y posterior filtración en embudos de cristal y mediante el uso de papel de filtro (B).

12.3.3. Transesterificación de ácidos grasos

Los lípidos totales obtenidos mediante el método gravimétrico de Folch, son sometidos al proceso de transesterificación. A grandes rasgos, la reacción de transesterificación implica tres grupos de reacciones según un éster reaccione con un alcohol (alcoholólisis), con un ácido carboxílico (acidólisis) o con otro éster (interesterificación) (Formo 1954). La reacción de transesterificación metanólica de lípidos algales, es aquella en la cual, una molécula de triglicérido reacciona con un alcohol (metanol) para dar ésteres metílicos o ésteres de ácidos grasos y glicerina (Schuchardt et al. 1998) (Figura M.16). Esta reacción consta de tres etapas consecutivas reversibles en las que el triglicérido es convertido consecutivamente en diglicérido, monoglicérido y glicerina (Freedman et al. 1986). Los lípidos totales se transesterificaron con ácido sulfúrico al 1% en metanol según la metodología descrita por Christie (1982).

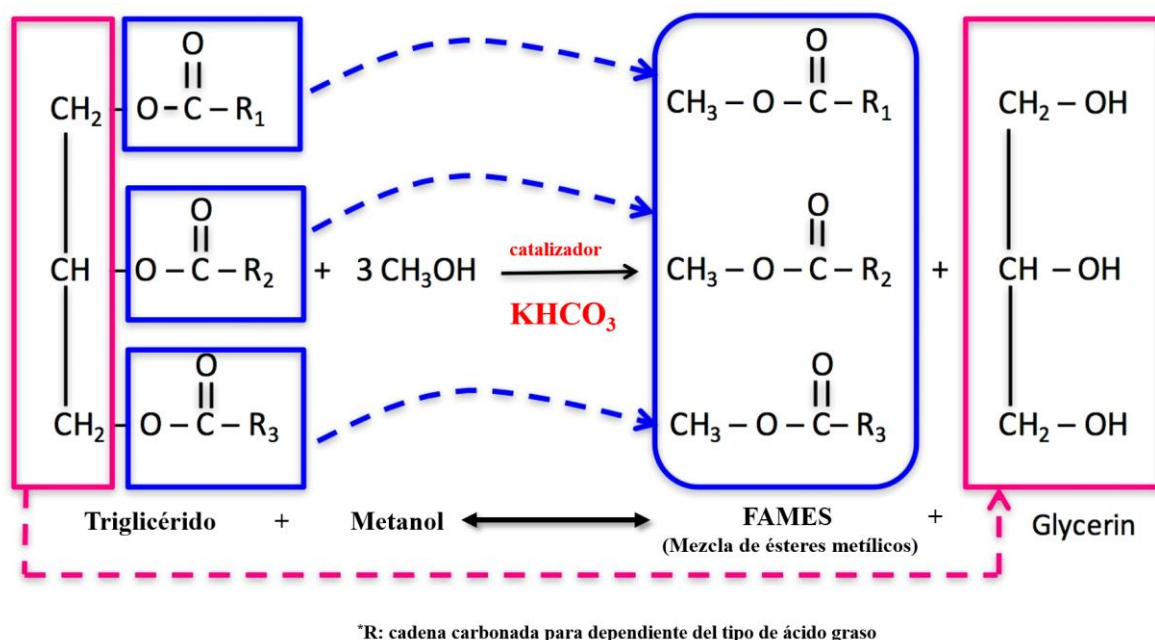


Figura M.16. Representación esquemática de la reacción de transesterificación de lípidos extraídos de macroalgas con metanol para producir ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES del inglés *Fatty Acid Methyl Esters*) que pueden ser aprovechados en su conjunto como biodiesel, y glicerina (glicerol) un subproducto.

El procedimiento a seguir para la transesterificación fue el siguiente: se añaden 1 mL de tolueno con BHT (50 mg L^{-1}) a un máximo de 80 mg de lípidos previamente obtenidos gravimétricamente. Los tubos se llenan con N_2 para evitar la oxidación y se sellan. Posteriormente, los tubos son incubados durante 16 h a 50°C en un baño termostatzado, en oscuridad y si es posible en agitación. Pasado este tiempo se dejan enfriar. A continuación, se añaden 3.5 mL de agua ultrapura (*Milli-Q*) y 4 mL de hexano: dietil éter (1:1) con BHT al 0.01% (m/v). Se agita y se centrifugan por 5 min a 5000 g. Realizado este paso, se transfiere la fase superior a un tubo nuevo. Al tubo de partida, se le vuelven a añadir 4 mL de hexano: dietil éter (1:1) (ahora sin BHT). Acto seguido, se añaden 3 mL de KHCO_3 al 2% al tubo que contiene las dos fases superiores extraídas, se agita, se centrifuga y se transfiere la fase superior a un tercer tubo. Por último, en cuanto a la fase de transesterificación los tubos se someten a evaporación con N_2 para eliminar el solvente orgánico.

Realizados los pasos anteriores, se impregna un cartucho sep-pack amino de NH_2 con 1-2 mL de Hexano y se disuelven los FAMES con 1-2 mL de Hexano. La muestra es transferida al cartucho y se coloca un tubo debajo para ser obtenida gota a gota (gravimétricamente) y con ayuda de un sistema de vacío (Figura M.17). Nuevamente, la muestra ya recogida y pasada por el cartucho, se evapora hasta la sequedad, se pesa y se diluye hasta alcanzar una concentración de 40 mg de FAMES por mL de Hexano. Finalmente, las muestras se pasan a viales septum, los cuales, serán llevados al cromatógrafo de gases.

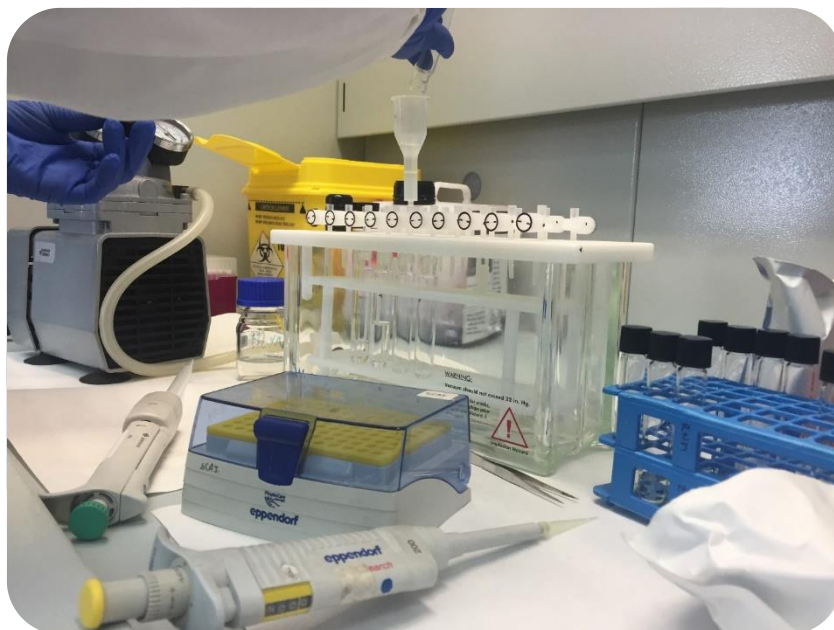


Figura M.17. Filtrado en cartuchos sep-pack de NH₂ usando una bomba de vacío.

12.3.4. Caracterización y cuantificación de FAMEs

La caracterización y cuantificación de los FAMEs, se realizó mediante cromatografía de gases. Se empleó un cromatógrafo de gases modelo Focus GC (Thermo Scientific, EE.UU.) el cual se ubica en los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la UMA (Figura M.18). El procedimiento analítico se realizó de acuerdo a las condiciones descritas por Izquierdo et al. (1990).



Figura M.18. Cromatógrafo de gases y automuestreador acoplado utilizados en este trabajo

En el método de separación de los FAMES se empleó una columna fuerte BPX70 (70% cianopropil polisilfenileno-siloxano) 60 m x 0,25 mm y 0.25 mm de diámetro de la marca SGE Analytical Science y helio como gas transportador. La temperatura inicial de la columna fue de 140°C durante 10 min, luego se elevó a 240°C a razón de 2.5 °C min⁻¹ y por último se mantuvo a 240° C durante 10 min más. La detección de los FAMES se realizó a través de un detector FID y la cuantificación según tiempos de retención referenciados a un patrón estándar de FAMES (Supelco 37 comp. 47885-U) compuesto por 37 tipos de ésteres metílicos de ácidos grasos.

13. Métodos para determinar la capacidad antioxidante

Métodos no enzimáticos: la actividad antioxidante no puede ser medida directamente, pero puede ser determinada por los efectos del compuesto antioxidante en un proceso de oxidación controlado. Según Clarkson (1995), en la medición de una muestra oxidante, pueden usarse intermediarios o productos finales para valorar la actividad antioxidante. La actividad antioxidante de una muestra no puede ser determinada basándose solamente en un ensayo de prueba, sino que en la práctica, se realizan muchos métodos para la evaluación de la capacidad antioxidante tanto *in vitro* como *in vivo*. Sin embargo, es necesario considerar que los modelos presentan diferentes variaciones y por lo tanto, pueden dificultar un poco la comparación de los resultados entre un método y otro. Con base a las reacciones químicas, la gran mayoría de los ensayos para determinar de capacidad antioxidante se fundamentan en dos mecanismos de reacción:

1. Ensayos basados en la reacción por transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) como el DPPH y ABTS entre otros.
2. Ensayos basados en la reacción por transferencia de electrones (ET) (Huang et al. 2005), como el BBM entre otros.

Métodos enzimáticos: las células de todos los organismos, son protegidas contra el estrés oxidativo gracias una compleja red de enzimas antioxidantes (Davies 1995, Sies 1997). El superóxido (O₂⁻) liberado por procesos como la fosforilación oxidativa, primero es convertido en peróxido de hidrógeno (H₂O₂) e inmediatamente reducido para generar H₂O. Esta ruta de detoxificación es el resultado de múltiples enzimas con la superóxido dismutasa (SOD) catalizando el primer paso y luego las catalasas (CAT) y varias peroxidasas (POX) que eliminan el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) intermediario. Todas ellas fueron evaluadas en esta Tesis Doctoral (**Capítulo 4**) con la finalidad de profundizar en el metabolismo antioxidante en algas expuestas a UVR y N.

13.1. Antioxidantes totales

13.1.1. ABTS

El método ABTS es uno de los métodos espectrofotométricos que más han sido aplicados para medir la capacidad antioxidante total de soluciones o sustancias puras. La técnica para la generación del radical catión $ABTS^+$, implica la producción directa del cromóforo $ABTS^+$ verde-azul a través de la reacción entre ABTS (2, 2'-Azinobis-3-etil-benzo-tiazolina-6-ácido sulfónico) y persulfato potásico ($K_2S_2O_8$) (Re et al. 1999). Este radical generado, presenta tres máximos de absorción a las longitudes de onda de 342, 413, 645, 727 y 811 nm lo cual confiere al método una ventaja con respecto a otros métodos antioxidantes al disponer de varias longitudes de onda que no solapan con moléculas presentes en la mezcla a evaluar. La adición de los antioxidantes al radical preformado lo reduce a ABTS (Figura M.19). De esta manera el grado de decoloración puede ser cuantificado espectrofotométricamente como porcentaje de inhibición del catión $ABTS^+$ por adición de una sustancia antioxidante.

Para llevar a cabo el ensayo, se preparó una disolución acuosa que contenía 7 mM de ABTS y 2.45 mM de persulfato potásico (solución ABTS), manteniéndose en oscuridad y a temperatura ambiente durante al menos 12-16 h para garantizar la completa formación y estabilidad del radical $ABTS^+$. Pasado este tiempo, en una cubeta de cuarzo de 1 mL se añadieron progresivamente: 940 μ L de PBS 50 mM (pH = 7), 10 μ L de solución de $ABTS^+$ (de forma que la absorbancia del conjunto sea de entre 0.7-0.75 aproximadamente) y 50 μ L de muestra. Se tomaron medidas de absorbancia antes de añadir la potencial sustancia antioxidante (absorbancia inicial) y una vez añadida, se agitó bien y se tomaron lecturas pasados los 7-8 min de reacción (absorbancia final). El cálculo de la actividad antioxidante se realizó de la siguiente manera:

$$AA\% = [(A_{(inicial)} - A_{(8min)}) / A_{(inicial)}] \cdot 100$$

donde: $A_{inicial}$ = es la absorbancia en el tiempo cero y A_{8min} = es la absorbancia al finalizar la reacción (8 min). En este trabajo, la absorbancia se midió a 413 nm.

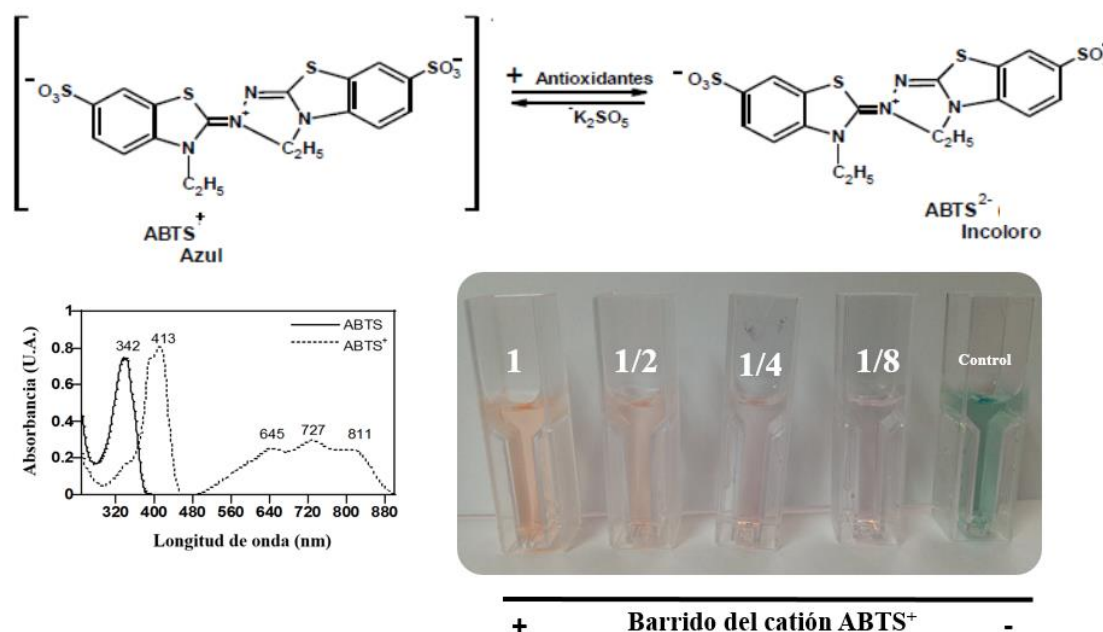


Figura M.19. Estructura molecular del catión ABTS⁺ y mecanismo de reacción con el extracto potencialmente antioxidante obtenido de la biomasa algal. Modificado de Zulueta et al. (2009). Ejemplo de decoloración del radical mediante adición de diluciones seriadas de extracto hidroalcohólico de *Gelidium corneum*.

13.1.2. DPPH

Entre los métodos para cuantificar la capacidad antioxidante, el método DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo) es el más rápido, el más simple (no incluye muchos pasos para la realización del ensayo) es de menor costo en comparación con otros métodos. Sin embargo, solo cuantifica la fracción hidrofílica de las soluciones o extractos, a diferencia del método ABTS el cual se puede aplicar a antioxidantes que se encuentren en una matriz hidrofílica o lipofílica (Alam et al. 2012). Este método fue propuesto por Blois (1958) en el cual se demostró por primera vez la capacidad del radical libre DPPH[•] para aceptar un átomo de hidrógeno proveniente de una molécula de cisteína. La molécula DPPH es conocida por actuar como un radical libre. El procedimiento analítico en esta tesis, se hizo de acuerdo al método modificado por Brand-Williams et al. (1995). Para ello, se utilizó un volumen de 150 μ L (de una solución 1.27 mM de DPPH en metanol 80%), 1.35 mL de metanol al 80%, y posteriormente se añadieron 50 μ L de muestra. Hecho esto, la reacción da comienzo y tras 30 min a temperatura ambiente ($\sim 20^\circ$) se midió la absorbancia a 517 nm (Figura M.20). Los cálculos se hicieron en base al procedimiento empleado por Kulisic et al. (2004) y es exactamente el mismo que para el método ABTS, a diferencia del tiempo.

$$AA\% = [(A_{(\text{inicial})} - A_{(30\text{min})}) / A_{(\text{inicial})}] \cdot 100$$

donde: A_{inicial} = es la absorbancia en el tiempo cero y $A_{30\text{min}}$ = es la absorbancia al finalizar la reacción (30 min) a 517 nm.

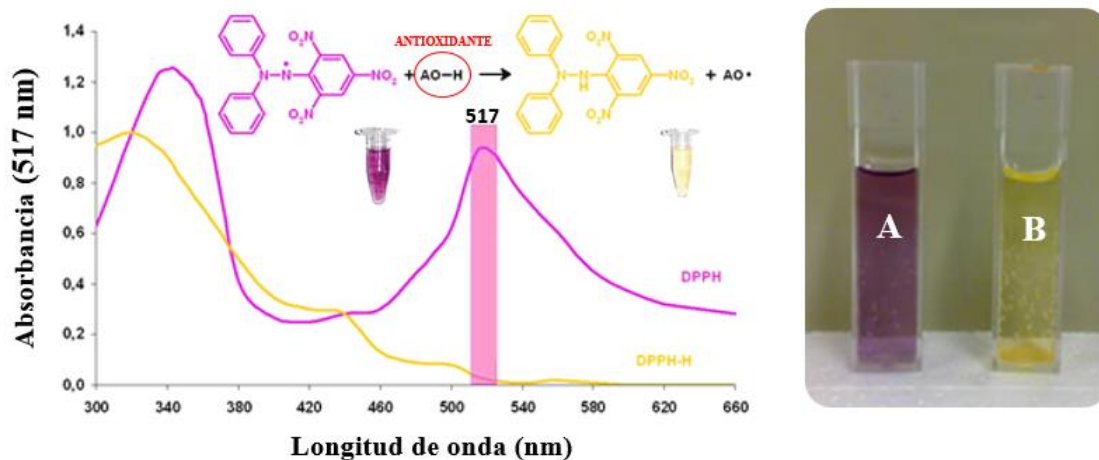


Figura M.20. Estructura molecular del radical DPPH y mecanismo de reacción para el método DPPH. Neutralización/decoloración completa del radical DPPH (B) por acción de antioxidantes presentes en el extracto (*Gracilariopsis longissima*). En la cubeta control (A), debido a que no hay sustancias antioxidantes, el radical DPPH no es neutralizado.

13.1.3. Método de decoloración del β -caroteno (BBM)

El método de decoloración del β -caroteno (BBM por sus siglas en inglés: *β -carotene bleaching method*) es ampliamente utilizado para la determinación de la capacidad antioxidante de diferentes algas con interés biotecnológico (Duan et al. 2006; Wang et al. 2009; Millao & Uquiche 2016). Se trata de un método espectrofotométrico que mide la inhibición que causa un antioxidante sobre la decoloración del β -caroteno en un sistema acuoso emulsificado con Tween 20 (Monolaurato de polioxietilen (20) sorbitano) y ácido linoleico (Ácido (9Z, 12Z)-9,12-Octadecadienónico). El β -caroteno presenta un máximo de absorción a 470 nm. Este máximo varía cuando la molécula se oxida, ya que pierde dobles enlaces y la estructura del cromóforo de la molécula se ve alterada, perdiendo así su característico color naranja pudiendo ser detectado espectrofotométricamente (Figura. M.21) (Jayaprakasha et al. 2001). La actividad de la solución se evaluó según el grado de decoloración del β -caroteno, aplicando la fórmula propuesta por Hidalgo et al (1994) con algunas modificaciones:

$$AA\% = [(P_{\text{muestra}} - P_{\text{control}}) / (P_{\text{Referencia}} - P_{\text{control}})] \cdot 100$$

donde: P = pendiente de las curvas de decoloración obtenidas (Abs/tiempo) para la muestra a ensayar, para el control (emulsión + solvente) y para el antioxidante de referencia (trolox).

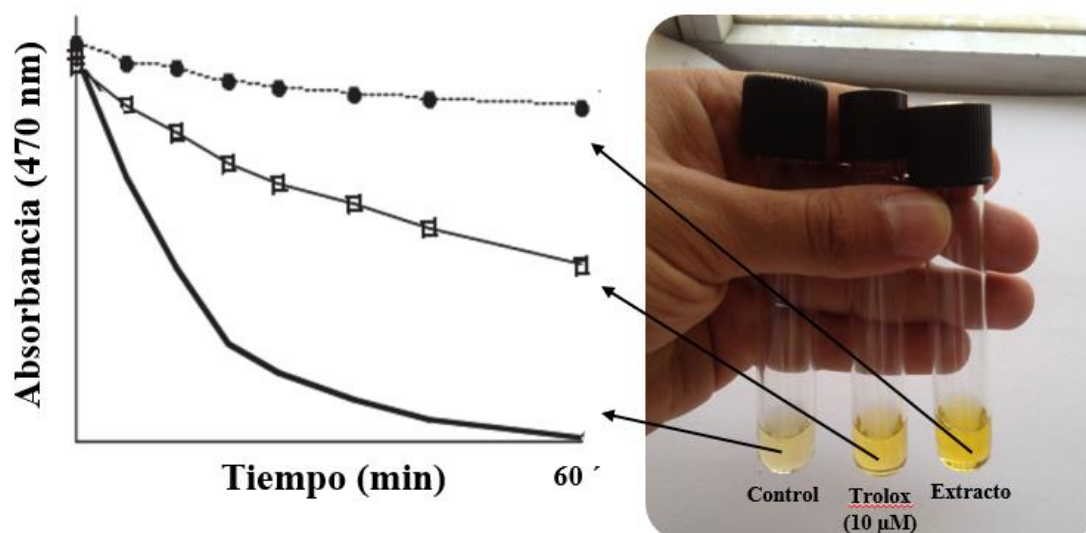


Figura M.21. Cinética de decoloración del β -caroteno para el control (solo emulsión), para una solución de Trolox (10 μ M) y para 250 μ L de extracto hidroalcohólico de *Gracilariopsis longissima*.

13.1.4. Expresión de la actividad antioxidante total

Como antioxidante de referencia para los 3 métodos antioxidantes empleados en esta Tesis (ABTS, DPPH y BBM), se utilizó trolox (ácido-6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcroman-2-carboxílico). Esta es la sustancia antioxidante más empleada por los investigadores (Oehlke et al. 2011). Es un análogo químico de la Vitamina E con gran potencia antioxidante (Davies et al. 1988) y con su uso, pueden realizarse comparaciones con otras investigaciones sobre la capacidad antioxidante de sustancias de distinta índole (diferentes proporciones de los reactivos, concentraciones y tiempos de medición). Para cada uno de los métodos, se realizó una curva patrón con concentraciones de entre 1–50 μ M. Los resultados se expresaron como μ mol TEAC (del inglés, *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) g^{-1} PS. Para los tres métodos descritos anteriormente, se empleó un espectrofotómetro UVMini-1240 (modelo Shimadzu, Columbia, USA).

13.2. Enzimas antioxidantes

13.2.1. Glutación reductasa (GR)

La glutatión reductasa (GR) es una flavoenzima dependiente del NADPH que cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH) el cual será utilizado por la glutatión peroxidasa (GPX) para la reducción del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y de lipoperóxidos (L-OOH), los cuales, son elementos tóxicos para la célula. El sistema antioxidante GPX/GR está relacionado con otros sistemas antioxidantes como el superóxido dismutasa/catalasa (SOD/CAT). Se ha observado que ambos sistemas no actúan a la par, la CAT actúa en presencia de altas

concentraciones de H_2O_2 y a bajas concentraciones actúa la GPX. La actividad de la CAT y de la GPX está inversamente correlacionada, mientras que la CAT y la GR presentan correlación positiva.



Para la cuantificación de esta enzima (GR), se empleó el método de acuerdo a Goldberg & Spooner (1983). Se añadieron 500 μL de PBS (PBS: 0.2 M, pH 7) + 380 μL de H_2O + 50 μL de GSSG (20 mM en H_2O) + 20 μL de muestra + 50 μL de NADPH (2 mM en 10 mM de TRIS-HCl). Una vez se añade el volumen de NADPH la reacción comienza y se monitoriza la caída de absorbancia del NADPH medida a 340 nm a 20 °C durante 1-3 min. A partir del coeficiente de extinción molar del NADPH (6.3 mM cm^{-1}) se calcula la cantidad de μmoles transformados de NADPH por min. En el control (en lugar de extracto solo lleva PBS), la pendiente en Absorbancia vs tiempo, ha de ser próxima a 0, ya que aquí no debe de haber decaimiento del NADPH al no haber enzima.

$$\text{U GR mL}^{-1} = (\Delta A_{340} / 6.3) \cdot 1000$$

donde: U GR mL^{-1} = unidad de glutatión reductasa se define como la cantidad de enzima necesaria para reducir una concentración de NADPH por min.

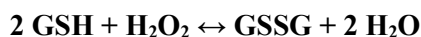
Posteriormente, estas unidades son corregidas en base al contenido proteico (soluble) de la muestra:

$$\text{U GR mg}^{-1} \text{ TSP} = (\text{U GR mL}^{-1}) / (\text{mg TSP} \cdot \text{mL}^{-1})$$

donde: TSP = mg de proteínas solubles totales en 1 mL de extracto. Así pues, mediante la relación PF/PS y el contenido en proteínas solubles de cada alga estudiada con anterioridad, estas unidades pueden ser expresadas como U GR mg TSP por PS.

13.2.2. Glutatión peroxidasa (GPX)

La enzima Glutatión peroxidasa (GPX) cataliza la reacción de oxidación de glutatión a glutatión disulfuro utilizando para ello H_2O_2 usando como cofactor el selenio. La GPX tiene como principal función proteger a la célula del efecto degradante de los hidroperóxidos formados de forma endógena.

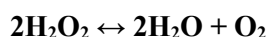


Para determinar esta enzima, se empleó la metodología propuesta por Overbaugh & Fall (1982). En este caso, si la muestra contiene GPX, se producirá la reacción dando como producto glutatión oxidado (GSSG). El glutatión oxidado se medirá con la misma reacción del método de la GR, añadiendo en este caso glutatión reductasa pura, más los sustratos de dicha reacción. Para ello, se

colocaron en una cubeta de reacción, los siguientes componentes en orden: 750 μL de PBS (0.2 M, pH = 7) + 50 μL de H_2O_2 (4 mM) + 50 μL de GSH (20 mM en H_2O_d) + 50 μL de glutatión reductasa (2.5 U mL^{-1}) + 50 μL de muestra + 50 μL (10 mM en TRIS-HCl). El cálculo se hizo de la misma forma que para GR citada en el apartado anterior.

13.2.3. Catalasa (CAT)

La catalasa (CAT) es una enzima perteneciente a la categoría de las oxidorreductasas que cataliza la descomposición del H_2O_2 en O_2 y H_2O .



El método consiste en medir el decaimiento en la concentración de H_2O_2 a 240 nm (Aebi 1984). Para llevar a cabo este ensayo, se homogenizó 100 mg de muestra en 2 mL de PBS 50 mM (pH = 7.5) y 20 μL de una solución 1 mM de PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo, PMSF del inglés *phenylmethylsulfonyl fluoride*) que actúa como inhibidor de proteasas (James 1978). La muestra (extracto algal) se sometió a centrifugación a 3000 g por 15 min a 4°C. La reacción consiste en añadir 50 μL del extracto a un volumen de PBS 0.1 M que contenga 20 mM de H_2O_2 y monitorizar la caída de esta molécula a 240 nm por acción de la CAT presente en la muestra. Se monitorizó el decaimiento de la absorbancia cada 15 segundos durante 3 min. El cálculo de la cantidad de CAT presente en la muestra se determina graficando la absorbancia a 240 nm frente al tiempo. Así pues, se calculó la actividad de CAT con la siguiente ecuación:

$$\text{U CAT mL}^{-1} = (\Delta A_{240} / 0.0394) \cdot 1000$$

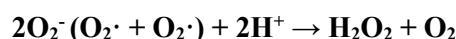
donde: U CAT mL^{-1} = unidad de catalasa se define como la cantidad de enzima necesaria para reducir un μmol de H_2O_2 por min y 0.0394 (mM cm^{-1}) es el coeficiente de extinción de H_2O_2 a 240 nm.

Posteriormente, estas unidades son corregidas en base al contenido proteico (soluble) de la muestra de igual forma que para la Glutatión reductasa (GR).

13.2.4. Superóxido dismutasa (SOD)

La enzima superóxido dismutasa (SOD), protege a la célula de las reacciones dañinas del radical superóxido. La reacción de superóxido con especies no radicales no es permitida por spin según las reglas de selección. En sistemas biológicos esto significa que sus principales reacciones son con sí mismo (dismutación) o con otro radical biológico como el óxido nítrico (NO). El anión radical de superóxido (O_2^-) espontáneamente dismuta a O_2 y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) de forma bastante rápida ($\sim 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH 7).

En 1969, McCords y Fridovich descubrieron la enzima SOD aislada desde los eritrocitos, que catalizaba la reacción (McCord & Fridovich 1969):



En esta Tesis Doctoral (**Capítulo 4**) se utilizó el método de Suzuki (2000) basado en el uso Xantina/Xantina oxidasa como generador constante de radical superóxido el cuál, al entrar en contacto con el nitroazul de tetrazolio (NBT) lo reducirá y formará un producto llamado formazán cuyo cambio puede ser detectado espectrofotométricamente cuando la SOD inhibe la reducción del NBT. Para ello, se homogenizaron en una cubeta: 1.45 mL de solución de trabajo (preparada a partir de 100 mL de solución amortiguadora de sodio-carbonato 50 mM + 1.5 mg de Xantina + 20.4 mg de NBT + 2.9 mg de EDTA), 25 µL de la solución de XO (0.1U de XO en 1mL de sulfato de amonio 2M) y 25 µL de blanco (PBS 50 mM, pH = 7.5). Se registró la absorbancia a 560 nm cada 30 segundos durante 5 min (A_{560}) para calcular el incremento (Δ) en la absorbancia por min a 560 nm.

$$\% \text{ Inhibición (\%)} = [(\Delta A_{560} \text{ Blanco} - \Delta A_{560} \text{ Muestra}) / (\Delta A_{560} \text{ Muestra})] \cdot 100$$

A partir del % Inhibición, se calculó el contenido de SOD presente en la muestra:

$$\text{U SOD mL}^{-1} = (\% \text{ Inhibición}) / (50 \cdot \text{mL de extracto})$$

Una unidad de actividad se define como la cantidad de SOD necesaria para inhibir el 50% de la reacción del O_2^- con el NBT. Posteriormente, estas unidades son corregidas en base al contenido proteico (soluble) de la muestra igual que en GR.

13.2.5. Peroxidasas totales (POX)

Las peroxidasas (POX) son un tipo de enzimas muy extendidas en los seres vivos. Pertenecen a la categoría de las oxidorreductasas que catalizan reacciones bisustrato de carácter redox, utilizando un peróxido como oxidante (a lo que deben su nombre) y un segundo sustrato de características reductoras que es oxidado por el peróxido. En líneas generales, la reacción bioquímica se puede simplificar de la siguiente forma:



La actividad de las enzimas POX se determinó mediante la técnica propuesta por Kar & Mishra (1976). Las muestras de biomasa fresca (100 mg) se homogenizaron en las mismas condiciones que en SOD y CAT. El extracto se colecta y se emplea para los análisis posteriores. En celdas de cuarzo se mezcla 1350 µL de agua, 125 µL de solución amortiguadora de fosfato (KHPO_4 , 100 mM, pH 7), 24.5 µL de H_2O_2 (50 mM), 500 µL de pirogalol (50 mM) y 500 µL del extracto enzimático. La mezcla de

reacción se incuba por 1 min a 25°C, y la reacción se detiene con la adición de 250 μL H_2SO_4 (5% v/v). Para el blanco, se mezclan todos los reactivos especificados anteriormente y en el mismo orden, sólo que la reacción se detiene inmediatamente después de agregar el volumen de extracto y se incuba. La actividad se determina espectrofotométricamente a 420 nm. Una unidad de actividad POX se define como la concentración de enzima necesaria para incrementar 0.1 unidades la absorbancia por min.

$$\text{U POX mg}^{-1} \text{ TSP} = (\Delta A_{420} / 0.1)$$

donde: la actividad de específica de POX se expresa como U de POX mg^{-1} de proteína.

13.2.6. Ascorbato peroxidasa (APX)

La ascorbato peroxidasa (APX) solo puede ser entendida dentro de un complejo ciclo, el Ciclo del agua-agua. Este ciclo implica, además, los metabolitos antioxidantes: ascorbato, glutatión y NADPH y las enzimas que unen estos metabolitos (Noctor & Foyer 1998). Esto supone una vía metabólica importante que detoxifica los organismos fotosintéticos del peróxido de hidrógeno (H_2O_2). En el primer paso de esta vía, el H_2O_2 se reduce a H_2O por acción de la APX, usando ascorbato como donador de electrones. El ascorbato ahora oxidado se regenera por la monodehidroascorbato reductasa (MDAR) (Wells & Xu 1994). En los organismos fotosintéticos, el ascorbato, junto con el glutatión, participa en la eliminación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en este denominado ciclo agua-agua (Asada 1999). Este ciclo comienza con la denominada reacción de Mehler. La reducción del oxígeno molecular (O_2) hasta superóxido y H_2O_2 por los electrones de la cadena de transporte electrónico fotosintético en el PSI se denomina “Reacción de Mehler” (Mehler 1951a, 1951b).

El método empleado en esta Tesis Doctoral es el propuesto por Miyake & Asada (1996). Se añadieron, en orden, 1 mL de PBS (50 mM, pH = 7) + 75 μL de H_2O_2 (0.1 mM) + 50 μL de ascorbato (50 mM) + 100 μL de muestra. La reacción comienza al añadir un volumen determinado de extracto. Una vez iniciada la reacción se monitoriza la caída de absorbancia del ascorbato medida a 290 nm a 20 °C durante 1-3 min. Se mide a 290 nm para no interferir con la medición de la caída de H_2O_2 debido a CAT. El máximo de absorción del ascorbato es 265 nm pero a esta longitud de onda también absorbe el H_2O_2 . De esta forma solo se observa la caída del ascorbato sin interferencia del H_2O_2 . A partir del coeficiente de extinción molar del ascorbato (2.8 mM cm^{-1}) se calcula la cantidad de μmoles transformados de ascorbato por min.

$$\text{U APX mg}^{-1} \text{ TSP} = (\Delta A_{290} / 0.1)$$

14. Compuestos fenólicos

El método utilizado para la determinación de los compuestos fenólicos fue el método fotocolorimétrico de Folin-Ciocalteu (Folin & Ciocalteu 1927). El reactivo de Folin-Ciocalteu es una mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato, usado para la determinación de compuestos fenólicos y polifenólicos (Singleton et al. 1999). Este reactivo, reacciona con los grupos fenólicos formando un complejo azul el cual puede ser cuantificado espectrofotométricamente a 760 nm (Vinson et al. 2005). Para ello, se toman 30-50 mg de peso seco de alga y se homogeneiza empleando 4 mL de metanol (80%) mediante el uso de un ultra-turrax (T10, Ika Works Inc., EE.UU.). Posteriormente se deja extraer durante 24 h en oscuridad y a 4 °C. Tras este tiempo, se centrifuga el extracto a 10000 g durante 15 min., a 4 °C. A continuación, se toman 100 µL del sobrenadante y se mezcla con 6 mL de agua destilada, 0.5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu y se agita vigorosamente y rápidamente añadiendo 1.5 mL de Na₂CO₃ (20%). El volumen de ensayo se completa con 1.9 mL de agua destilada para llegar a 10 mL. Finalmente se deja reaccionar durante 2 h en oscuridad a 4 °C, y se toman alícuotas (250 µL) que se colocan en pocillos de una placa ELISA para cuantificar espectrofotométricamente la absorbancia a 760 nm en un lector de placas (BIO-TEK, FL600). Se realizó una curva patrón con floroglucinol (0-300 µg mL⁻¹).

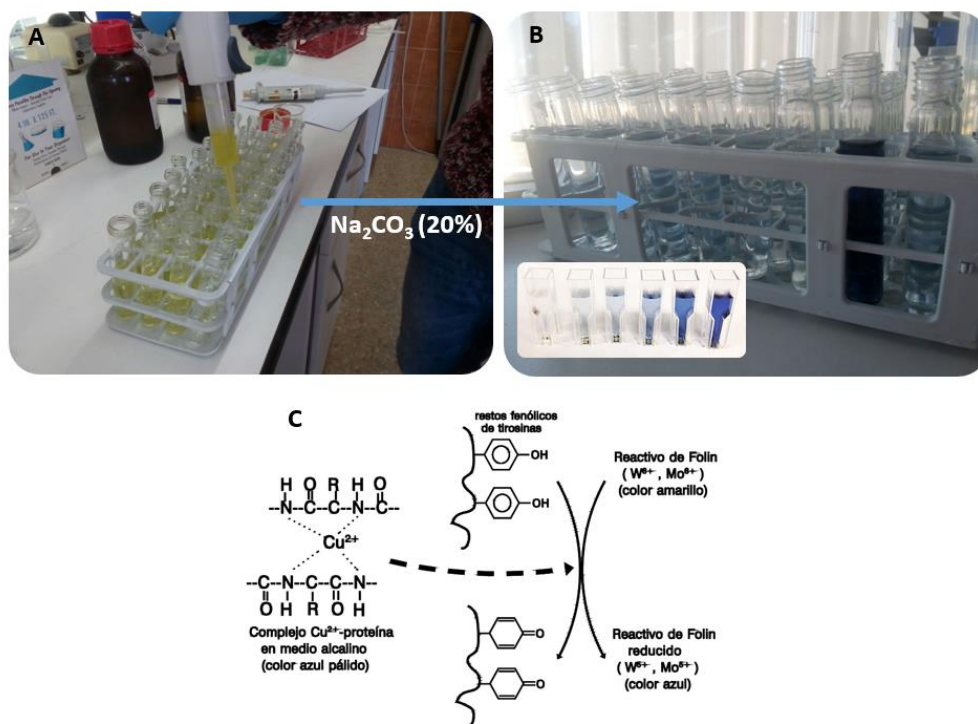


Figura M.22. Ensayo fotocolorimétrico de Folin-Ciocalteu. Adición de reactivo de Folin-Ciocalteu (A). Cambio de coloración por adición del catalizador carbonato sódico (Na₂CO₃ al 20%) (B). Mecanismo de reacción entre compuestos fenólicos y reactivo de Folin para obtener el cambio de

coloración (C) el cual fue alicuotado en pocillos de placa ELISA para posteriormente medir la absorbancia.

15. Aminoácidos tipo micosporina (MAAs)

15.1. Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

Los aminoácidos tipo micosporina (MAAs) se cuantificaron de acuerdo a Karsten et al. (1998) con ciertas modificaciones (Korbee-Peinado et al. 2004). Se tomaron entre 10-20 mg de peso seco de la biomasa a analizar. Posteriormente, se somete a una extracción en 1 mL de metanol (20%) y en un baño termostatzado a 45°C durante 2 h. Transcurrido ese tiempo, se tomaron entre 600-800 μ L del sobrenadante y se llevó a sequedad en un concentrador centrífugo al vacío (Jouan RC 10-09, Francia) (Figura M.23). Por último, el pellet es resuspendido en el mismo volumen retirado (600-800 μ L) pero en esta ocasión usando metanol 100% (calidad analítica para HPLC) para eliminar las sales y proteínas presentes. Las muestras se analizaron en un equipo Waters 600 (Waters Cromatografía S.A., Barcelona) de HPLC (Cromatografía líquida de alta eficiencia). Antes de ser inyectadas, las muestras se filtraron usando un filtro de 0.2 μ m, para eliminar posibles residuos que pudiesen afectar al equipo.



Figura M.23. Extracción de MAAs a partir de diferentes liofilizados conseguidos mediante extracción con distintos solventes para diferentes especies algales empleadas en esta Tesis Doctoral (**Capítulo 1**).

La columna empleada para la separación de los MAAs en el HPLC fue una C₈ (Luna, Phenomenex, Alemania) con un material de relleno esférico de 5 μ m de diámetro, el tamaño de dicha columna fue de 250 x 4.6 mm; se empleó una precolumna afín a la columna empleada. La fase móvil fue una solución acuosa compuesto por 1.5% de metanol y 0.15% de ácido acético, filtrada y

desgasificada. Se usaron condiciones de bajo pH ya que, en estas condiciones, los MAAs presentan una carga positiva y se comportan por tanto como cationes muy débiles. Se inyectó un volumen de muestra de 10 μL , que pasaba a un flujo isocrático de 0.5 mL min^{-1} . El tiempo de elución fue de 15-20 min. Se empleó un detector de UV y visible (Detector de fotodiodos 996) (Figura M.24) que hacía un barrido para cada muestra entre 290 y 400 nm, tomando datos cada segundo para cada longitud de onda de entre este rango seleccionado. Los datos fueron recogidos y analizados empleando el programa informático Empower 2 Chromatography Data Software.



Figura M.24. Equipo de HPLC empleado con todos sus componentes: inyector de muestra automático (A), equipo de bomba de alta presión, mezclador, válvula, desgasificador y bomba de purga (B), columna de separación (C) y detector UV-vis (D).

La identificación de los picos en los cromatogramas se hizo según sus espectros y tiempos de retención. Para ello se compararon con los estándares extraídos de organismos marinos cuya composición de estos aminoácidos es bien conocida. Los distintos tipos de MAAs que podemos encontrar comúnmente en macroalgas marinas presentan sus correspondientes máximos de absorción, coeficientes de extinción y sus pesos moleculares necesarios para la cuantificación de estos metabolitos (Korbee et al. 2006). Para el cálculo de la concentración en $\text{mg MAA} \cdot \text{g}^{-1} \text{PS}$, se empleó la siguiente fórmula basada en la Ley de Lambert-Beer:

$$\text{mg MAA g}^{-1} \text{PS} = A \cdot Q / \varepsilon \cdot V \cdot \text{PS} \cdot 60$$

donde: A = área de pico ($\mu\text{V s}^{-1}$); Q = caudal volumétrico (mL min^{-1}); ε = coeficiente de extinción molar para cada aminoácido (g L^{-1}); V = volumen de inyección (mL) y PS = peso seco de la muestra (mg).

16. Espectrometría de masas (ESI-MS)

La ionización por electrospray (del inglés, *Electrospray ionization* o ESI) es una técnica utilizada en espectrometría de masas para producir iones (ESI-MS). Es especialmente útil en la producción de iones a partir de macromoléculas, pues supera la propensión de estas moléculas a fragmentarse cuando se ionizan. El análisis de MAAs y compuestos fenólicos (bromofenoles) se llevó a cabo mediante ESI-MS usando un equipo TQ Varian mod. 1200 L, triple cuadrupolo (Agilent Technologies, Santa Clara, California, EE.UU.) ubicado en los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación (SCAI) en la Universidad de Málaga. El equipo TQ, está provisto de una sonda (HESI-II) la cual permite la ionización por electrospray calentado y transformando los iones de la solución en iones en la fase de gas en combinación con un gas auxiliar calentado. Para el análisis de MAAs, la preparación de muestras se hizo de acuerdo a la metodología descrita por Barceló-Villalobos et al. (2017). Para ello, se tomaron entre 10-20 mg de PS de la biomasa a analizar en 1 mL de MeOH (100%). La composición de la fase móvil fue: A (acetonitrilo / ácido fórmico al 0.1%) y B (agua / fosfato de amonio 5 mM). El flujo se ajustó a 0.20 mL min^{-1} . Para la separación molecular, se utilizó una columna HILIC (Thermo Fisher Scientific) cuya temperatura de la misma se estableció a 30°C (temperatura del autoamplificador 10°C). El registro de los MAAs, se hizo en modo positivo en un intervalo de 100-700 m/z. Para los compuestos fenólicos, el procedimiento analítico fue exactamente igual, salvo en la preparación del extracto, donde se tomaron también 10-20 mg de PS de la biomasa a analizar pero en 1 mL de solvente MeOH al 80%.

17. Citotoxicología e inmunología

Dentro de la batería de ensayos *in vitro* como métodos de toxicología alternativa útiles y necesarios para el registro o solicitud de ensayos clínicos de una sustancia dada, se encuentran los llamados ensayos de citotoxicidad, capaces de detectar mediante diferentes mecanismos celulares conocidos, los efectos adversos de interferencia con la supervivencia celular, la proliferación y/o las funciones fisiológicas (Repetto 2003). Además, los ensayos inmunológicos permiten analizar la respuesta inmune de la línea celular relacionada con estos procesos (RAW 264.7), mediante cuantificación de las proteínas (citoquinas) implicadas en este mecanismo (IL-6 y TNF- α). En el **Capítulo 5** de esta Tesis Doctoral, se evaluó la citotoxicidad de los extractos de *H. cornea* y *G. longissima*, en tres líneas celulares: macrófagos murinos (RAW 264.7), fibroblastos gingivales (HGF) y queratinocitos inmortales humanos (HaCaT) cuyas características principales se detallan a continuación:

- **RAW 264.7**: línea celular de tipo macrófago derivada de tumores inducidos en ratones macho BALB / c, por el virus de la leucemia murina Abelson (Kim et al. 1999). Esta línea se usó tanto para determinar la citotoxicidad, como para determinar la respuesta inmunológica al ser una línea celular relacionada con el sistema inmune.
- **HGF**: fibroblastos gingivales humanos (McAllister et al. 1993). Células del tejido conectivo. Sintetiza fibras y mantiene la matriz extracelular del tejido de muchos animales. Estas células proporcionan una estructura en forma de entramado (estroma) a muy diversos tejidos y juegan un papel crucial en la curación de heridas, siendo las células más comunes del tejido conectivo
- **HaCaT**: línea celular de queratinocitos inmortales aneuploides de la piel humana adulta (Boukamp et al. 1988), ampliamente utilizada en la investigación científica (Schoop et al. 1999). Las células HaCaT se utilizan por su gran capacidad para diferenciarse y proliferar *in vitro*. Estas células han permitido la caracterización de varios procesos, como su utilización como sistema modelo para el metabolismo de la vitamina D3 en la piel (Lehmann 1997).

17.1. Ensayos citotóxicológicos

La citotoxicidad celular se define como una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a un daño o disfunción celular que puede ser detectado y cuantificado. Diferentes autores han desarrollado ensayos en toxicología experimental *in vitro* para predecir los efectos tóxicos de sustancias y compuestos químicos, utilizando como modelos experimentales cultivos primarios y órganos aislados como líneas celulares establecidas y normalizadas. Entre ellos, el ensayo de viabilidad celular (MTT) empleado en esta Tesis Doctoral. Este método es simple y ampliamente usado para determinar la viabilidad celular (supervivencia). La reacción bioquímica de este ensayo acontece en las mitocondrias (Gad-Shayne 1999), por lo tanto, el MTT (Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazoil)-2,5-difeniltetrazólico) cuyo color es amarillo, es captado por las células y reducido por la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial a su forma insoluble formazán (color morado). Este formazán, posteriormente será cuantificado espectrofotométricamente (Eisenbrand et al. 2002) (Figura M.25).

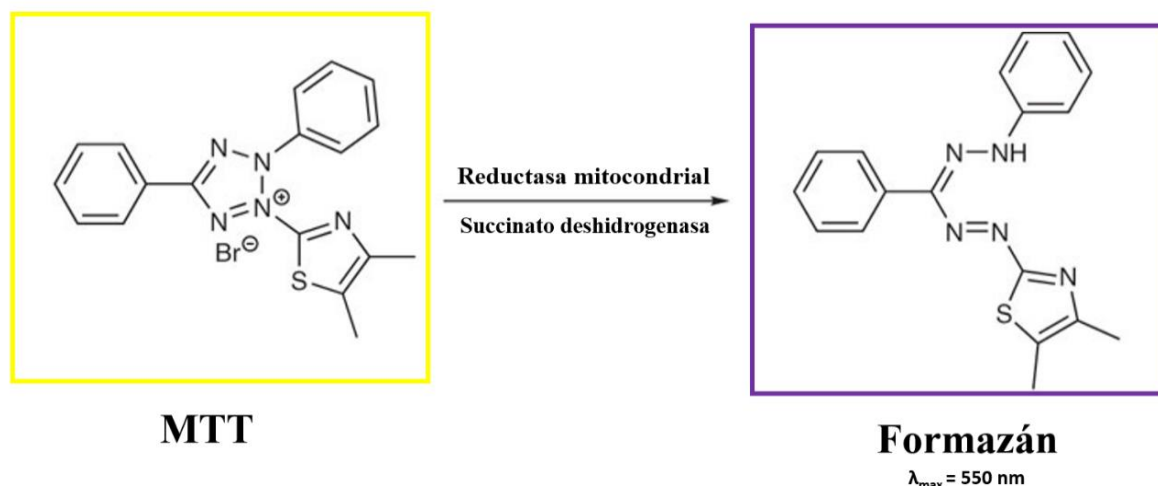


Figura M.25. Reacción bioquímica del MTT (amarillo) a formazán (morado) por acción de la enzima mitocondrial (succinato deshidrogenasa).

El producto de la reacción (formazán) queda retenido en las células y puede ser liberado mediante la solubilización de las mismas. Así pues, se asume que la cantidad de células viables presentes en el cultivo es proporcional a la cantidad de formazán producido. Este método fue desarrollado por Mosmann (1983) siendo modificado posteriormente por Denizot & Lang (1986). Por lo tanto, la capacidad de las células para reducir al MTT constituye un bioindicador de la integridad mitocondrial y su actividad funcional siendo interpretada como una medida de la viabilidad celular. La determinación de la capacidad de las células de reducir el MTT a formazán después de su exposición a un compuesto/s permite obtener información acerca de la toxicidad del compuesto que se pretende evaluar (Jiménez et al. 2008).

Las líneas celulares que se emplearon para el ensayo MTT, se cultivaron en un medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal de bovino, 2 mM L-glutamina, 100 unidades mL^{-1} de penicilina sódica, 0.1 mg mL^{-1} de estreptomicina sulfatada y 0.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de anfotericina B. Las células se cultivaron a 37 °C con aire humedecido que contenía un 5% CO_2 . Pasado un tiempo y cuando el cultivo alcanzó la densidad celular deseada (confluencia), las células se colectaron mediante un raspado ligero. Se utilizaron las células cuando la confluencia había alcanzado un 75%.

El procedimiento para llevar a cabo los ensayos de viabilidad celular, consiste en preparar una suspensión celular de $6 \cdot 10^4$ células mL^{-1} en medio de cultivo DMEN. Este medio de cultivo es una modificación de medio Basal Medium Eagle (BME) conteniendo 4 veces la concentración de aminoácidos. Así pues, para la realización del ensayo, los pocillos han de contener 3000 células aproximadamente (esto puede depender del tipo de línea celular empleado). Por lo tanto, en una microplaca de 96 pocillos se fueron añadiendo por cuadruplicado los siguientes volúmenes:

- Para el control: 50 μ L de medio DMEN + 50 μ L de Suspensión celular
- Para los tratamientos: 50 μ L de extracto (a partir de un extracto que contiene 20 mg de liofilizado de extracto algal en 1 mL de DMEN) + 50 μ L de medio de suspensión celular. Ensayo de realiza haciendo diluciones seriadas de este liofilizado de extracto disuelto en medio DMEN.

Posteriormente se incubaba durante 72 h a 37 °C en una atmósfera húmeda y 5% de CO₂. Pasado este tiempo, se añadió 10 μ L de solución de MTT (5 mg MTT mL⁻¹ de PBS) y se incubó por 4 h. El precipitado cristalino que se formó se solubilizó con 150 μ L con isopropanol ácido (HCl 0.04 N). Por último, se determinó la densidad óptica a 550 nm en el espectrofotómetro para microplacas (BIO-TEK, FL600).

Los resultados se expresan como porcentaje (%) de células vivas, según la siguiente relación:

$$\text{Viabilidad celular (VC\%)} = (\text{Abs}_{\text{tratamiento}} \cdot \text{Abs}_{\text{control}}) \cdot 100$$

donde: Abs_{tratamiento} = es la absorbancia de las células tratadas y Abs_{control} = es la absorbancia de las células control, es decir, aquellas que no han sido sometidas a la sustancia objeto de estudio.

A partir de la viabilidad celular (%), mediante graficación y obtención de la ecuación de la recta (Viabilidad celular en % VS Concentración de extracto en mg mL⁻¹), se calcula interpolando, qué concentración de extracto produce la reducción de la viabilidad celular en un 50%. A este parámetro se le denomina EC₅₀. Valores bajos de EC₅₀ indicarían una menor viabilidad celular como consecuencia de los efectos de la concentración del extracto empleado. Es necesario destacar que la “viabilidad celular” para este ensayo sería antagonista a la “muerte celular”, por lo tanto, una viabilidad del 50% indicaría que un 50% de las células tratadas viven y un 50% de las células tratadas mueren.

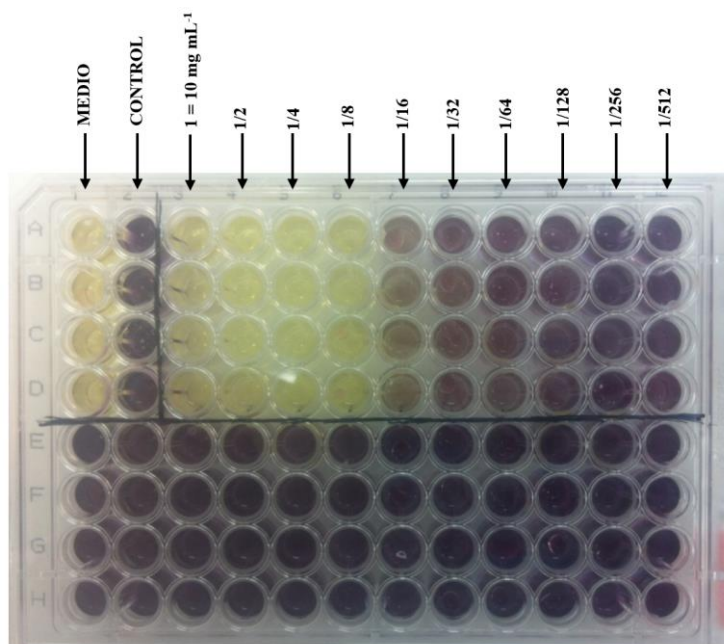


Figura M.26. Ejemplo de ensayo de viabilidad celular en placa ELISA mediante diluciones seriadas para extracto acuoso de *Hydropuntia cornea*. En los pocillos control, a las células solo se les añadió medio DMEN por lo que la viabilidad es el 100%.

Para el **Capítulo 3**, se realizó también el ensayo MTT pero en talos vivos de *G. longissima* para los diferentes tratamientos experimentales. Para ello, se pesaron 250 mg de PF de biomasa. Los talos se lavaron cuidadosamente con agua de mar estéril y se incubaron con 30 μ L de solución madre de MTT (0.17 g L^{-1}) en un tubo de ensayo con agua de mar esterilizada (volumen final de 3 mL) a 37°C durante 3 h. Los fragmentos de algas se lavaron en agua destilada y se transfirieron a un tubo de ensayo que contenía 1 mL de DMSO (Merck, Darmstadt, RFA) (Mendes et al. 2013). La absorbancia también fue medida con un espectrofotómetro de microplacas (BIO-TEK FL600) a 570 nm. La viabilidad celular se calculó y expresó en porcentaje de viabilidad celular (VC%) siguiendo los cálculos descritos anteriormente para las líneas celulares *in vitro*, pero considerando ahora como control, es decir, una VC del 100%, la absorbancia obtenida de las muestras de *G. longissima* sometidas al tratamiento más favorable (HN-PAR).

17.2. Ensayos inmunológicos

Las citoquinas son proteínas de bajo peso molecular esenciales para la comunicación intercelular. Son producidas por varios tipos celulares relacionados con el sistema inmunológico. Estos mediadores solubles están implicados y controlan muchas funciones fisiológicas críticas como: diferenciación y maduración celular, inflamación y respuesta inmune local y sistémica, reparación tisular, reproducción celular, cicatrización, metabolismo energético, hematopoyesis, apoptosis y muchos otros procesos biológicos. Son moléculas señalizadoras que comunican unas células con otras,

y son tan importantes como las hormonas o neurotransmisores. Se estudiaron dos tipos de citoquinas en esta Tesis Doctoral, el factor de necrosis tumoral (TNF- α , del inglés *Tumor Necrosis Factor*) y la interleucina IL-6.

Para la determinación de las citoquinas, se empleó, al igual que para uno de los ensayos de citotoxicidad, la línea celular RAW 264.7. En este ensayo, las células RAW 264.7 se cultivaron en presencia de diferentes concentraciones de extractos algales de *H. cornea* y *G. longissima* (0-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) en microplacas de 24 celdas (5×10^5 células celda $^{-1}$) y en un volumen total de 1 mL. Se utilizó lipopolisacáridos bacterianos (LPS) como control positivo (50 ng mL $^{-1}$) para la activación de los macrófagos. El sobrenadante se recolectó después de una incubación de 48 h y se utilizó para determinar la producción de citoquinas después de la estimulación por LPS. La producción de TNF- α e IL-6 se determinó mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) de acuerdo con el protocolo descrito por Martínez et al. (1998). Posteriormente, se utilizaron los anticuerpos purificados TNF- α o IL-6 monoclonales de rata antirató (0.5 mg, BD Pharmingen) para cubrir las celdas a una concentración de 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 4 °C por 16 h. Después de lavar y bloquear con PBS salino (PBS) conteniendo 3% de albúmina de suero bovino, se añadieron los sobrenadantes de los cultivos a cada una de las celdas por 12 h a 4°C. El material no fijado se lavó y se añadieron los anticuerpos monoclonales biotinilizados antirató de TNF- α o IL-6 (0.5 mg, BD Pharmingen) a una concentración de 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ por 2 h. Los anticuerpos fijos se detectaron mediante la adición de avidina peroxidasa (Sigma) por 30 min y la adición posterior de una solución sustrato de ABTS. La absorbancia a 405 nm se monitoreó después de 10 min de la adición del sustrato. Se construyó una curva estándar usando varias diluciones de murina recombinante de TNF- α o IL-6 en PBS que contenían 10% de FCS (suero fetal de ternera). La cantidad de cada citoquina en los sobrenadantes de los cultivos se determinó por la extrapolación de las absorbancias a la curva estándar.

18. Preparación de productos cosméticos

Los preparados cosméticos se prepararon de acuerdo al diseño experimental descrito en el **Capítulo 6** de esta Tesis Doctoral. Se utilizó una máquina mezcladora Unguator 2100 (GAKO International GmbH, Múnich, Alemania) la cual permite obtener una perfecta homogenización de los productos empleados para la fabricación del cosmético en cuestión. Todos los componentes se mezclaron hasta alcanzar la homogeneidad entre todas las fases que la componen (fase oleosa, acuosa y adición de extractos algales en frío) (Figura M.27A-C). Todas las formulaciones se mezclaron a 750 rpm durante 2 min (Figura M.27D).



Figura M.27. Preparación y homogenización de los preparados cosméticos (A, B y C) mediante el uso de un mezclador Unguator 2100 (D).

19. Factores de Protección

19.1. Factor de Protector Solar (FPS): Colipa 2011

El Factor de Protección Solar indica cuánto tiempo más, un fotoprotector solar, aumenta la capacidad de defensa natural de la piel antes de llegar a producir eritemas actínicos o enrojecimiento de la piel, usando un producto de fotoprotección frente a un eritema previa a la quemadura. Por ejemplo, una persona de piel clara (fototipo I) que normalmente empieza a sufrir eritema después de 10 min al sol, tardaría 15 veces ese tiempo con un FPS 15 (150 min o 2.5 h) (Autier et al. 2000; Gilaberte et al. 2003).

Para el cálculo del FPS, los productos cosméticos elaborados en el **Capítulo 6**, se pesaron de forma precisa y rápida (para reducir la evaporación del producto) y se aplicaron 1.3 mg cm^{-2} en cada placa de PMMA (polimetilmetacrilato) de acuerdo al Método *in vitro* Europeo Colipa 2011 (Figura M.28A). Se distribuyeron de manera uniforme sobre la superficie de la placa con una punta del dedo cubierta con un guante de nitrilo (Figura M.28B). Para cada preparado cosmético, se prepararon tres placas, que se mantuvieron protegidas de la exposición a la luz y a temperatura ambiente ($\approx 20^\circ\text{C}$). Después de este periodo, las placas que contenían el producto se colocaron entre la trayectoria del haz de luz de un simulador solar y el espectrorradiómetro (Figura M.28C). El simulador solar empleado fue un Spectra-physics Modelo 66902 provisto de una lámpara de mercurio-xenón (Lamp Power 50-500 W). Este instrumento, genera la fuente lumínica de acuerdo al estándar de referencia, la cual ha de estar comprendida entre $51.4\text{-}63.7 \text{ W m}^{-2}$ para la irradiancia total (290-400 nm), y la relación UVA/UVB ha de estar entre 16.9-17.5 (Colipa 2011).

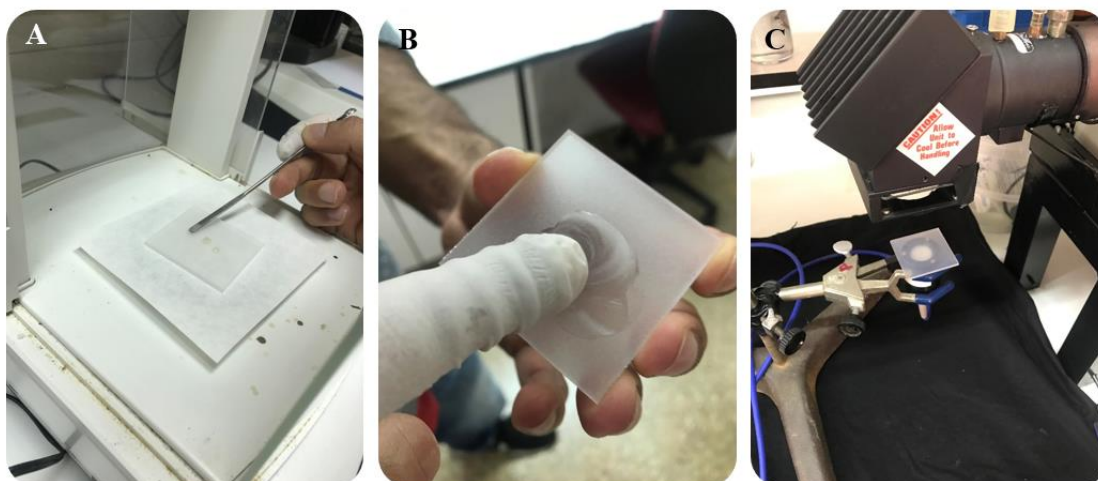


Figura M.28. Pesaje (A) y distribución del producto cosmético sobre la placa PPMA (B) y posterior irradiación de la placa mediante el uso del simulador solar (C) para la cuantificación de la irradiancia transmitida con el espectrorradiómetro (C).

La transmisión (%) de UVR a través de la muestra se midió a un intervalo espectral de 280 a 400 nm, a intervalos de 1 nm y en 5 sitios diferentes de la placa y empleando 3 réplicas (placas) por producto. El blanco se preparó utilizando las placas comerciales PMMA de acuerdo a las propiedades físicoquímicas descritas por Pissavini et al. (2009). Este método, describe el uso de glicerol como blanco para el ensayo (1.3 mg cm^{-2}) en la misma cantidad que el producto cosmético ya que el método Colipa 2011, asume que los fotoprotectores que se fabrican en la actualidad, presentan en su composición un alto porcentaje de glicerol. Con los datos obtenidos por el espectrorradiómetro, se calculan el Factor de Protección Solar (FPS) para el intervalo espectral de UVR comprendido entre 290-400 nm:

$$\text{FPS}_{in vitro} = \frac{\int_{\lambda=290nm}^{\lambda=400nm} E(\lambda) * I(\lambda) * d\lambda}{\int_{\lambda=290nm}^{\lambda=400nm} E(\lambda) * I(\lambda) * 10^{-A(\lambda)} * d\lambda}$$

donde: E = espectro de acción eritemático (CIE-1987); I = irradiancia espectral de la fuente (simulador solar) y A = absorbancia monocromática de la placa con el producto cosmético aplicado.

Realizando el mismo cálculo matemático descrito anteriormente para el FPS, se calculó el UVA_{FPS} , utilizando el intervalo espectral para la radiación UVA (320-400 nm). En lugar de utilizar el

espectro de acción eritemático como en el FPS, para el UVA_{FPS} se utiliza el espectro de acción para la pigmentación persistente (PPD, del inglés *Persistent Pigment Darkening*)

El valor de longitud de onda crítica (λ_c) para los productos ensayados se define como aquella longitud de onda en la que el área bajo el espectro de absorbancia para el producto irradiado (obtenido usando el método descrito anteriormente) de 290 nm a λ_c es 90% de la integral del espectro de absorción comprendido entre 290-400 nm, y se calcula de la siguiente manera:

$$\int_{290}^{\lambda_c} A(\lambda) d\lambda = 0.9 \int_{290}^{400} A(\lambda) d\lambda$$

19.2. Factores de protección frente a efectos biológicos (FAPEB)

El FPS frecuentemente usado en las formulaciones cosméticas, solamente evalúa la eficacia de los filtros solares en la prevención del eritema (el cual solo tiene en cuenta la región espectral UVB), por lo tanto, no proporciona una visión integradora del nivel de fotoprotección para otros efectos biológicos provocados por la radiación UVB o UVA. Así pues, el FAPEB se propone como un nuevo parámetro para diferentes efectos biológicos relacionado con distintas longitudes de UVR (UVA y UVB). Los procedimientos experimentales y matemáticos para el cálculo del FAPEB, son idénticamente iguales que para el FPS de acuerdo a Colipa 2011, pero en lugar de usar el “espectro de acción eritemático” para el FPS, o el “espectro de acción para la pigmentación persistente” para el UVA_{FPS}, se utilizan, para sus respectivos cálculos, los espectros de acción frente a efectos biológicos encontrados en la bibliografía (Tabla M.3).

Tabla M.3. Espectros de acción para los diferentes efectos biológicos estudiados

Efecto Biológico	UVR % (B/A)	Referencia
¹ Fototransformación Vit. D3	100 / 0	Webb et al. (1989)
¹ Inmunosupresión	100 / 0	De Fabo & Kripke (1980)
¹ Fotocarcinogénesis (no melanoma)	99 / 1	De Gruijl & Van der Leun (1994)
¹ Eritema	99 / 1	McKinlay et al. (1987)
¹ Fotoisomerización del ácido urocánico	86 / 14	Gibbs et al. (1993)
¹ Elastosis	64 / 36	Wulf et al. (1989)
¹ Fotoenvejecimiento	4 / 96	Bissett et al. (1989)
¹ Pigmentación persistente	3 / 97	Moyal et al. (2000)
¹ Immediate pigment darkening (IPD)	1 / 99	Irwin et al. (1993)
² Cataratas (<i>in vivo</i>)	100 / 0	Baum & Pitts (1997)
² Fotoqueratitis	100 / 0	Turnbull & Parisi (2003)
² Fotoconjuntivitis	100 / 0	Parisi & Kimlin (1999)
³ Daño ADN	100 / 0	Setlow (1974)
³ Peróxidos	74 / 26	Morliere et al. (1995)
³ Oxígeno singlete	4 / 96	Hanson & Simon (1998)

Dianas biológicas: ¹Dermis; ²Ojos y ³Nivel molecular

Cada efecto biológico se ve afectado en mayor o menor medida, por la calidad espectral ya sea UVB o UVA (Figura M.27).

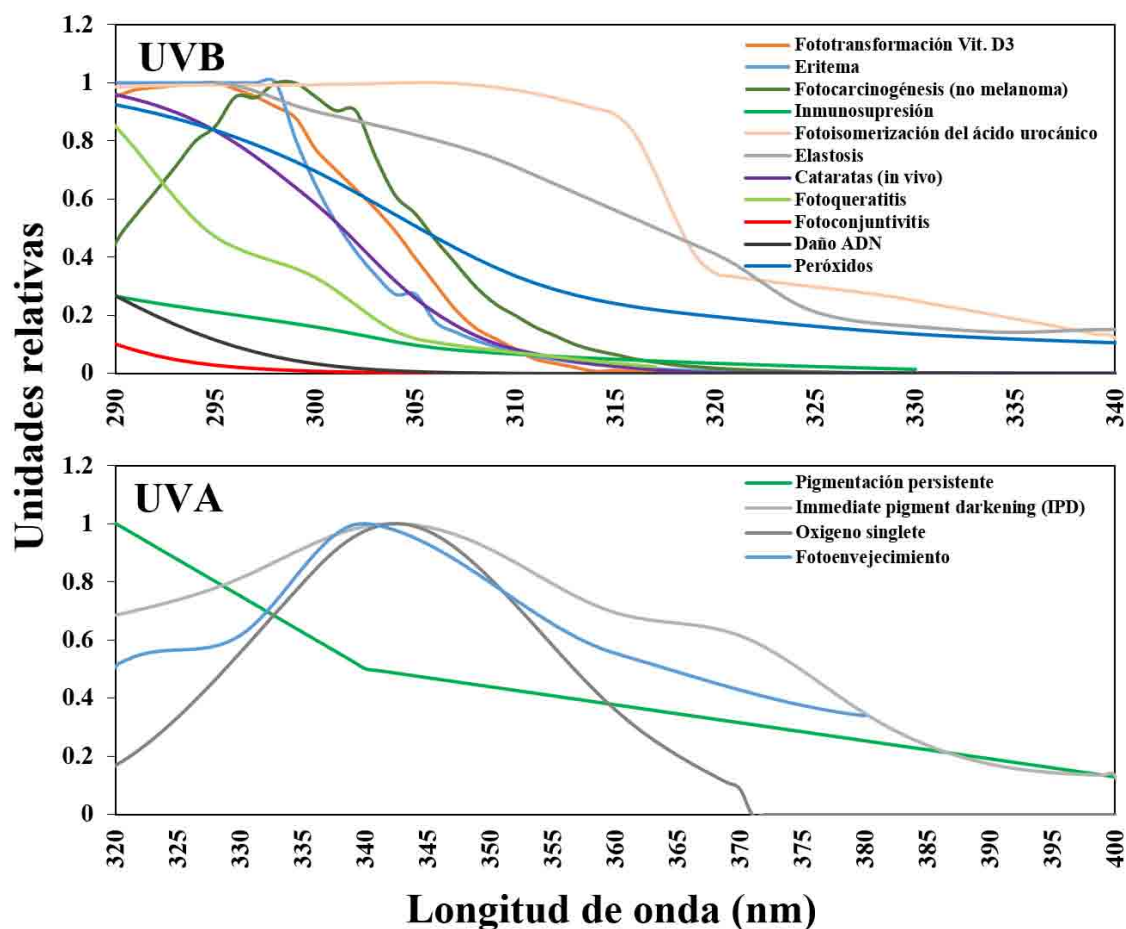


Figura M.27. Espectros de acción para los diferentes efectos biológicos producidos por UVA o UVB comprendidos en el FAPEB.

En el **Capítulo 6** de la presente Tesis Doctoral, se determinó el FPS y el FAPEB de extractos algales y de preparados cosméticos para un total de 15 espectros de acción con efectos biológicos en la dermis, ojos y en el nivel molecular.

20. Estadística

Los datos analizados en esta Tesis Doctoral se presentan como el Promedio \pm S.E. (del inglés: *Standard Error*), excepto en el **Capítulo 3**, donde los datos fueron presentados como Promedio \pm S.D. (del inglés: *Standard Deviation*) a petición de los revisores de la revista científica (Algal Research) donde fueron publicados los resultados de este capítulo. Para todos los capítulos, se realizaron fundamentalmente ANOVAS tanto de una vía como de dos o más vías (Factorial ANOVA) para encontrar interacciones entre los factores testados. Para el **Capítulo 1**, los factores a evaluar fueron “especies”, “solventes”, “método antioxidante” e interacciones entre estas variables independientes, mientras que para el **Capítulos 2**, los factores fueron el tiempo (T), la luz (L) y sus interacciones. Para

los **Capítulos 4 y 5**, los factores fueron el tiempo (T), luz (L), y disponibilidad de nutrientes (N) así como también las interacciones. Además, en los **Capítulos 2, 3 y 4**, los análisis ANOVA fueron anidados en el cilindro/tanque. Esta ANOVA anidada se empleó para estimar la diferencia entre los promedios de varios subgrupos cada uno localizado dentro de un grupo, en este caso el efecto intercilindro/intertanque identificando, así como las posibles diferencias existentes entre réplicas verdaderas (Underwood 1997).

En aquellas ANOVAS donde se encontraron efectos significativos ($p < 0.05$), se realizó un análisis post-hoc Student-Newman-Keuls (SNK) (Underwood 1997). Las correlaciones se realizaron calculando el coeficiente de correlación de Pearson (r) de acuerdo con Thaipong et al. (2006). Se empleó el software de SPSS para Windows (versión 21, IBM) en los análisis.

Además, para el **Capítulo 4**, donde las variables dependientes fueron numerosas y con la finalidad de tener una visión integradora de todas ellas, se realizó un análisis multivariante de ordenación (RDA) de acuerdo a la metodología descrita por Ter Braak & Prentice (1988) mediante el empleo del software CANOCO V.3.15. Los resultado de la ordenación fueron colocadas en un biplot ajustando los ejes en función de la varianza. Posteriormente, se evaluó la contribución relativa de cada variable de la ordenación establecida por el RDA mediante el test de permutación de Monte Carlo para las variables con 0.1% de nivel de significancia (Ter Braak 1990).

Capítulo 1

**Capacidad antioxidante y compuestos bioactivos en
extractos macroalgales y liquénicos mediante la aplicación
de diferentes solventes y métodos de evaluación**





Capacidad antioxidante y compuestos bioactivos en extractos macroalgales y liquénicos mediante la aplicación de diferentes solventes y métodos de evaluación

1

1. Resumen

En este primer capítulo, se realizó un estudio de ficoprospección, con la finalidad de seleccionar las especies cultivables o con potencialidad de ser cultivadas de manera intensiva en sistemas de Acuicultura Multitrófica Integrada (IMTA, del inglés “*Integrated Multi-Trophic Aquaculture*”) y para ser, posteriormente, empleadas en la extracción de compuestos bioactivos con aplicaciones nutracosméticas o cosmeceúticas. Para ello, se recolectaron diferentes macroalgas en distintas zonas del Sur de España con alta irradiancia solar (Gran Canaria, Málaga y Cádiz). Las especies seleccionadas fueron las macroalgas rojas *Gelidium corneum* (Hudson) J.V. Lamouroux, *Gelidium pusillum* (Stackhouse) Le Jolis, *Porphyra umbilicalis* Kützinger, *Halopithys incurva* (Hudson) Batters, *Gracilariopsis longissima* (S.G.Gmelin) M.Steentoft, L.M.Irvine & W.F.Farnham e *Hydropuntia cornea* (J.Agardh) M.J.Wynne y la macroalga verde *Ulva rotundata* Bliding. Como control positivo de compuestos bioactivos, aunque no sea una especie cultivable, se empleó el líquen marino *Lichina pygmaea*. Se prepararon extractos algales con diferentes solventes acuosos e hidroalcohólicos que potencialmente pueden contener compuestos bioactivos de interés biotecnológico. Se determinó la capacidad antioxidante mediante tres métodos: método de decoloración del radical catiónico ABTS⁺ (método ABTS), método de decoloración del radical DPPH[•] (método DPPH) y el método de decoloración del β -caroteno (método BBM). También se determinó la estequiometría C/N (índice C/N), el contenido de lípidos y carbohidratos totales y el contenido de fotoprotectores frente a UVR y con capacidad antioxidante (aminoácidos tipo micosporina: MAAs y compuestos fenólicos). Entre los solventes, el mayor rendimiento de extracción se observó en el solvente acuoso (H₂O) y metanólico (MeOH 20%). La mayor actividad antioxidante, expresada en equivalentes de Trolox, se encontró en los extractos de las macroalgas rojas, *H. cornea* seguido de los extractos de *G. longissima*, *H. incurva*, *P. umbilicalis* y *G. pusillum*, mientras que la actividad más baja se detectó en los de la macroalga verde *U. rotundata*. La actividad antioxidante se correlacionó con la composición de compuestos bioactivos sin descartar la acción sinérgica entre los compuestos evaluados. Se propone preferentemente el uso del método ABTS respecto al DPPH o BBM para la cuantificación de la capacidad antioxidante total en macroalgas, ya que este método valora la capacidad antioxidante tanto de compuestos hidro- como liposolubles.

El objetivo de este primer capítulo fue evaluar la actividad antioxidante de los extractos de algas marinas y de un líquen marino mediante la utilización de distintos solventes, relacionados con los diferentes mecanismos de acción, lo que se explicaría por la presencia de diversos metabolitos extraídos con estos solventes (Batista-González et al. 2009). Se cuantificó el contenido de compuestos algales y liquénicos con propiedades bioactivas potenciales como los carbohidratos, lípidos y sustancias fotoprotectoras y con capacidad antioxidante, como son los compuestos fenólicos y los aminoácidos de tipo micosporina (MAAs) (Stengel et al. 2011). Estos compuestos han demostrado tener aplicaciones importantes en una amplia gama de productos tanto en la industria alimentaria, como en la industria farmacéutica y cosmética. Las especies de este estudio, fueron seleccionadas en base a la capacidad de ser cultivadas, de manera intensiva, en sistemas de Acuicultura Multitrófica Integrada (IMTA) (Gómez-Pinchetti al., 2011) así como por el posible uso biotecnológico de la biomasa. Producida.

2. Material y métodos

2.1. Material biológico

Las especies, la división a la que pertenecen y el lugar de recolección, para este capítulo, son detallados a continuación en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1. Lista de especies estudiadas en esta Tesis Doctoral.

División	Especies	Origen (Ciudad, Provincia, País)	Coordenadas
Rhodophyta	<i>Gelidium pusillum</i>	Tarifa, Cádiz, España	36°00'10"N 5°36'33"O
	<i>Gelidium corneum</i>	Tarifa, Cádiz, España	36°00'10"N 5°36'33"O
	<i>Porphyra umbilicalis</i>	Tarifa, Cádiz, España	36°00'10"N 5°36'33"O
	<i>Halopithys incurva</i>	Tarifa, Cádiz, España	36°00'10"N 5°36'33"O
	<i>Gracilariopsis longissima</i>	Rio San Pedro, Cádiz, España	36°32'52"N 6°12'33"O
	<i>Hydropuntia cornea</i>	Gran Canaria, Las Palmas, España	27°59'28"N 15°22'8"O
Chlorophyta	<i>Ulva rotundata</i>	Málaga, Málaga, España	36°42'41"N 4°19'33"O
Ascomycota	<i>Lichina pygmaea</i>	Tarifa, Cádiz, España	36°00'10"N 5°36'33"O

2.2. Localidades de muestreo.

Las cuatro primeras especies de la Tabla 1.1 más el líquen, fueron obtenidas de la Isla de las Palomas, también conocida como Isla de Tarifa (Figura 1.1), actualmente unida a tierra mediante una carretera. Es la isla existente frente a la ciudad de Tarifa y cuyo extremo sur, la Punta de Tarifa, representa el punto más meridional de la península ibérica y de la Europa continental. Presenta un área de 0.3 Km². Casi toda la totalidad de la superficie de la isla se ha visto, además, muy alterada por la construcción de canteras de donde se extrajo sistemáticamente, desde época romana, roca caliza fosilífera para la construcción. Hasta 1808 la isla estuvo separada de Tarifa.

Desde mediados del siglo XX se establecieron gran cantidad de cuarteles y sus terrenos fueron propiedad del Ministerio de Defensa hasta que fueron declarados de Dominio Público Marino Terrestre en 1988. La posterior declaración en 2003 del Parque Natural del Estrecho de Gibraltar supuso la protección de la isla y de sus aguas más próximas debido a su gran valor ecológico, del cual, nos servimos para la elaboración de esta Tesis Doctoral.



Figura 1.1. Recolección de algas y el liquen marino en la Isla de las Palomas, Tarifa (Cádiz) el 19/03/2014.

Por otro lado, *Gracilariopsis longissima*, se recolectó en el Río San Pedro (Cádiz) (Figura 1.2). Este río es un paleocauce del río Guadalete, separado de éste por la mano del hombre. Se encuentra en la provincia de Cádiz. Al Río San Pedro desemboca cerca de su origen el caño de la Tapa, límite municipal entre Jerez de la Frontera y Puerto Real; atraviesa el norte de este último para seguidamente servir de divisoria entre Puerto Real y El Puerto de Santa María hasta su desembocadura en la Bahía de Cádiz, en la punta de los Saboneses. Tiene un recorrido de unos 25 km y la mayor parte de su cauce está bajo los efectos de la pleamar. El Río San Pedro es navegable para embarcaciones de pequeño calado y de pesca. El Río San Pedro y sus riberas se encuentran protegidas y forman parte del Parque Natural de la Bahía de Cádiz, por el cual se extiende como un brazo de mar, aportando agua marina a las salinas cercanas.



Figura 1.2. Río San Pedro y Marismas de Cádiz. Recolección de *Gracilariopsis longissima* en los esteros salinos. Fotos tomadas el 17/07/2016.

La clorofita, *Ulva rotundata*, se recolectó de la Playa de La Araña (Figura 1.3). Esta es una playa del distrito Este de la ciudad de Málaga (Andalucía, España). Se trata de una playa semiurbana de arena dorada situada en el litoral oriental de la ciudad, entre la playa del Peñón del Cuervo y el municipio de Rincón de la Victoria. Detrás de la Playa se encuentra una fábrica de cemento. La playa tiene unos 400 metros de longitud y unos 25 metros de anchura media. Es una playa muy frecuentada y casi sin equipamientos ni servicios.



Figura 1.3. Playa de la Araña, Málaga (Cementera al fondo).

Por último, *Hydropuntia cornea*, fue obtenida de cultivos originales que han sido mantenidos por más de 25 años en tanques de 750-1000 L, creciendo de forma vegetativa, en los sistemas de cultivo intensivos del Banco Español de Algas (BEA) en Taliarte (Gran Canaria, Islas Canarias, España) (Figura 1.4). El Banco Español de Algas (BEA) es un servicio nacional de I+D+I gestionado por la Fundación Canaria Parque Científico Tecnológico de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria que tiene como objetivos básicos el aislamiento, identificación, caracterización, conservación y suministro de microalgas.



Figura 1.4. Banco Español de Algas, Taliarte (Gran Canaria).

2.3. Extracción de compuestos con solventes alcohólicos y hidroalcohólicos.

A partir de las muestras recolectadas en los diferentes lugares anteriormente citados, se realizaron extracciones con diferentes solventes con la finalidad de cuantificar la máxima extracción de componentes con interés biotecnológico en los diferentes medios. La biomasa recolectada fresca y limpia, se secó entre pliegos de papel para eliminar el exceso de humedad y se congeló a -20°C hasta el momento de extracción. Para cada extracto se utilizaron 10 g de peso fresco de alga empleando piezas de talo enteras. Los talos se trocearon y trituraron en una ultra-turrax (T10, Ika Works Inc., USA) con 150 mL en cuatro solventes diferentes:

- Agua destilada (H_2O)
- Metanol:Agua (20:80). (MeOH 20%)
- Etanol:Agua (50:50). (EtOH 50%)
- Etanol 100%. (EtOH 100%)

La ruptura mecánica con ayuda del homogenizador se llevó a cabo en frío (usando hielo en la plataforma), de este modo se evitó la destrucción térmica de los componentes. A continuación, los extractos se sometieron a una maceración en recipientes de vidrio opacos (para evitar procesos fotolíticos) e introduciendo una atmósfera de N_2 en su interior (Figura 1.5). El proceso se llevó a cabo a $45^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 6 h en un baño termostatzado (Grant Instruments Ltd SS40-2). Se realizaron barridos espectrales (desde 280-700 nm) a lo largo del tiempo para visualizar gráficamente la extracción de sustancias mediante amplitud de picos para un mismo volumen de extracto. Transcurrido este tiempo, los extractos se filtraron a través de una malla de $50\text{ }\mu\text{m}$ y posteriormente se sometieron a una centrifugación (10.000 g) en una centrifuga Beckman GS-15 R durante 10 min a 4°C .

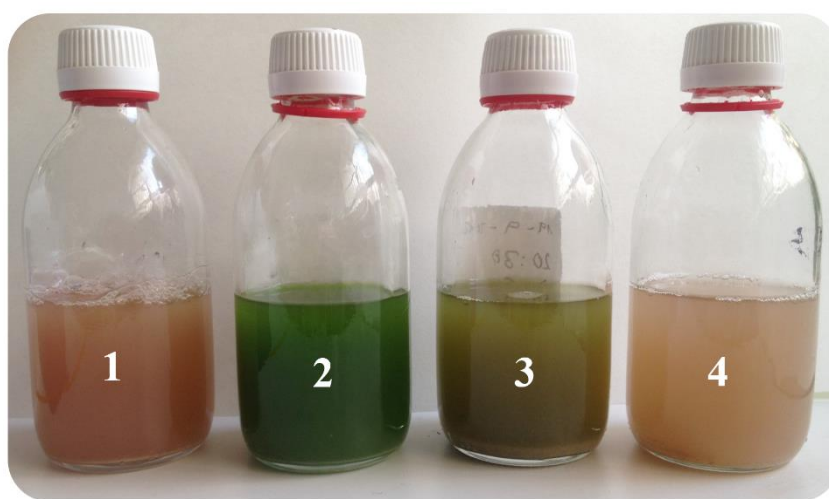


Figura 1.5. Extractos concentrados de *Gelidium corneum* extraídos con H_2O (1), EtOH 100% (2), EtOH 50% (3) y MeOH 20% (4). Apréciase la diferencia entre la composición pigmentaria en base al solvente extractor empleado. Los extractos se vertieron en botes de vidrio transparentes para la realización de la fotografía.

Por último el sobrenadante obtenido se rotavaporó en un rotavapor Büchi R-210 (Flawil, Suiza) conectado a una bomba de vacío Büchi V-700 hasta llevar a una concentración de (1:10) a una temperatura de $42^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Finalmente los extractos obtenidos se liofilizaron en un liofilizador Telsar Cryodos -80 (IMA-Telstar, Spain) en tubos falcon de 50 mL. Una vez finalizado el proceso de liofilización, se volvió a introducir una atmósfera de N_2 dentro de los tubos para mantener la integridad molecular a lo largo del tiempo (Figura. 1.6).



Figura 1.6. Ejemplo de etapas de obtención de extractos de *Hydropuntia cornea* con propiedades bioactivas. Extracción por ruptura mecánica (1), filtración en malla (2), concentración de sustancias por rotavaporación (3), extracto concentrado 10x en balón de rotavaporación (4), extracto resultante (5), liofilización (6), extracto liofilizado (7), aplicación de atmósfera inerte de N₂ al material liofilizado (8).

2.4. Rendimientos de extracción

Los rendimientos de extracción (η %) para cada solvente se calcularon de acuerdo a Chan et al. (2014) con algunas modificaciones. Para ello, los extractos son sometidos a rotavaporación para eliminar el solvente en su totalidad. El sólido resultante tras la rotavaporación comprende todos los componentes que dicho solvente ha sido capaz de solubilizar. El cálculo del rendimiento de extracción o de solubilización se calcula como la relación porcentual entre el solubilizado obtenido y la biomasa de partida.

$$\eta (\%) = (\text{Solubilizado obtenido} / \text{Biomasa de partida}) \times 100$$

Para los extractos producidos a partir de las muestras recolectadas, se hicieron los siguientes análisis: evaluación de la relación PF/PS, actividades antioxidantes totales por DPPH, BBM y ABTS; carbohidratos, análisis de MAAs y compuestos fenólicos totales.

3. Resultados

La relación PF/PS fue de 4.75 para *Gelidium pusillum*, 3.05 para *Gelidium corneum*, 5.60 para *Porphyra umbilicalis*, 3.68 para *Halopithys incurva*, 7.57 para *Gracilariopsis longissima*, 9.17 para *Hydropuntia cornea*, 2.54 para *Ulva rotundata* y 3.67 para *Lichina pygmaea*. El contenido de agua de las especies estudiadas varió entre 60 y 90% (Tabla 1.2) y el porcentaje de materia orgánica varió de

entre 9.4% en *H. incurva* a los valores de 6% *G. longissima* y *H. cornea*. El porcentaje de cenizas fue muy alto en *U. rotundata* y *L. pygmaea* (aproximadamente el 32%), mientras que el valor mínimo fue de 5.3% en *H. cornea* (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Contenido de carbono y nitrógeno, humedad, materia orgánica (M.O.) y cenizas expresados en porcentaje para las diferentes especies. Cada valor se representa como media \pm S.E. ($n = 3$). % C,% N y C/N expresado en peso seco (m/m). La humedad (%), materia orgánica (%) y cenizas (%) se expresó en base al peso fresco. Las letras diferentes en una misma columna implican diferencias significativas entre las especies ($p < 0.05$).

Especies	C (%)	N (%)	C/N	Humedad (%)	M.O. (%)	Cenizas (%)
<i>Gelidium pusillum</i>	36.1 \pm 0.0 ^b	3.8 \pm 0.0 ^g	9.4 \pm 0.1 ^b	79.1 \pm 1.3 ^c	6.7 \pm 0.9 ^a	13.3 \pm 1.3 ^{bc}
<i>Gelidium corneum</i>	35.8 \pm 0.1 ^b	3.6 \pm 0.0 ^f	10.0 \pm 0.1 ^b	71.7 \pm 0.3 ^b	6.6 \pm 1.4 ^a	24.9 \pm 0.2 ^d
<i>Porphyra umbilicalis</i>	30.2 \pm 0.4 ^c	2.9 \pm 0.1 ^e	10.5 \pm 0.4 ^b	82.1 \pm 0.7 ^d	8.4 \pm 0.5 ^a	12.4 \pm 0.4 ^b
<i>Halopithys incurva</i>	29.3 \pm 0.5 ^d	1.7 \pm 0.1 ^c	17.1 \pm 0.4 ^c	70.6 \pm 0.2 ^b	9.4 \pm 1.3 ^a	16.9 \pm 2.2 ^c
<i>Gracilariopsis longissima</i>	30.2 \pm 0.3 ^c	1.6 \pm 0.0 ^b	19.5 \pm 0.7 ^d	85.4 \pm 1.1 ^e	5.5 \pm 0.7 ^a	8.5 \pm 0.7 ^a
<i>Hydropuntia cornea</i>	26.6 \pm 0.2 ^c	1.5 \pm 0.1 ^b	18.2 \pm 0.7 ^c	88.9 \pm 0.5 ^f	5.7 \pm 0.5 ^a	5.3 \pm 0.9 ^a
<i>Ulva rotundata</i>	22.2 \pm 0.1 ^a	2.4 \pm 0.0 ^d	9.5 \pm 0.0 ^b	60.6 \pm 0.3 ^a	5.8 \pm 0.9 ^a	31.9 \pm 1.5 ^c
<i>Lichina pygmaea</i>	38.9 \pm 0.1 ^g	6.2 \pm 0.1 ^h	6.3 \pm 0.0 ^a	59.4 \pm 0.9 ^a	7.4 \pm 0.3 ^a	32.2 \pm 0.9 ^c

El rendimiento de extracción fue significativamente diferente ($p < 0.01$) dependiendo del solvente utilizado (Figura 1.7). El orden de los rendimientos de extracción para las especies en su conjunto fue, de mayor a menor, el siguiente: MeOH 20% - H₂O; H₂O - EtOH 50% y EtOH 50% = EtOH 100%.

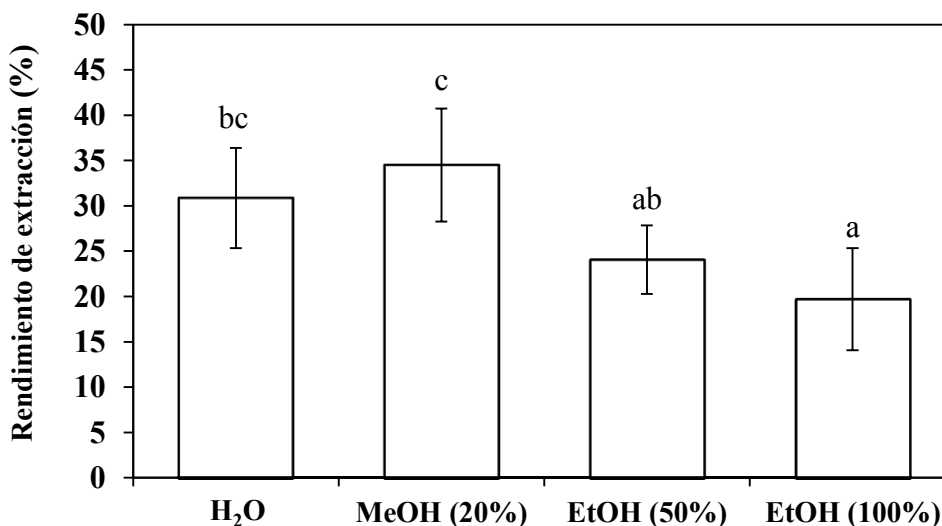


Figura 1.7. Rendimiento de extracción (% Rendimiento (m/m)) para los solventes. Los datos son expresados como la media de todas las especies analizadas (media \pm S.E.; $n = 27$). Diferentes letras indican diferencias significativas entre los solventes ($p < 0.05$).

Las capacidades antioxidantes de las ocho especies (7 algas y 1 líquen) se probaron con tres métodos antioxidantes. En el caso de los métodos DPPH y ABTS, el solvente que mostró el valor más alto en los ensayos fue el EtOH 50% con valores de 66.7 y 44.4% para las especies estudiadas respectivamente. Sin embargo, en el método BBM, el solvente con el mejor resultado fue EtOH 100% alcanzando los resultados más altos en el 44.7% de las especies. Para todas las especies de macroalgas, se encontraron interacciones significativas entre los factores “solvente y método” ($p < 0.01$). En *G. pusillum*, la mayor actividad para el método DPPH ($9.65 \mu\text{mol TEAC g}^{-1} \text{PS}$) ($p < 0.01$) se encontró en EtOH al 50% (Figura 1.8 A). Se observó la mayor capacidad antioxidante en ambos solventes etanólicos (EtOH al 50% y EtOH al 100%). En el caso de *P. umbilicalis* (Figura 1.8 C), el solvente acuoso mostró resultados similares para DPPH y ABTS. La actividad antioxidante para DPPH y BBM fue también la misma para los extractos de H₂O, EtOH al 100% y MeOH al 20% ($P > 0.05$). El solvente que mostró la mayor capacidad de extracción de compuestos antioxidantes para esta especie fue EtOH 50% ($10.7 \mu\text{mol TEAC g}^{-1} \text{PS}$) para el método DPPH. En *H. incurva* (Figura 1.8 D), se alcanzó la mayor capacidad antioxidante ($10.7 \mu\text{mol TEAC g}^{-1} \text{PS}$) en el solvente MeOH (20%) para el método DPPH. No hubo diferencias significativas entre el EtOH 50% y MeOH 20%, así como para los solventes H₂O y EtOH 100% en el método BBM. En *G. longissima*, los métodos DPPH y ABTS no mostraron diferencias significativas en términos de capacidad antioxidante para los solventes MeOH 20% y H₂O (Figura 1.8 E).

No hubo diferencias significativas entre los métodos BBM y DPPH en EtOH 50%. En general, se encontró la mayor actividad antioxidante en el solvente etanólico. *H. cornea* mostró la mayor capacidad antioxidante entre las especies estudiadas con valores máximos de aprox. $14.5 \mu\text{mol TEAC g}^{-1} \text{PS}$ en extractos etanólicos (Figura 1.8 F). *U. rotundata* presentó una menor capacidad antioxidante que las algas rojas analizadas, siendo el valor más alto encontrado, el obtenido con EtOH 50% para el método DPPH ($4.46 \mu\text{mol TEAC g}^{-1} \text{PS}$) (Figura 1.8 G).

En *L. pygmaea* (Figura 1.8 H) utilizando el método DPPH, la actividad antioxidante fue ligeramente superior para MeOH 20% y EtOH 100% que para los otros dos solventes. Para el método ABTS, la actividad antioxidante en H₂O y EtOH 100% fue menor que en los otros extractos (Figura 1.8). Sin embargo, el valor más alto según el método BBM se encontró en H₂O.

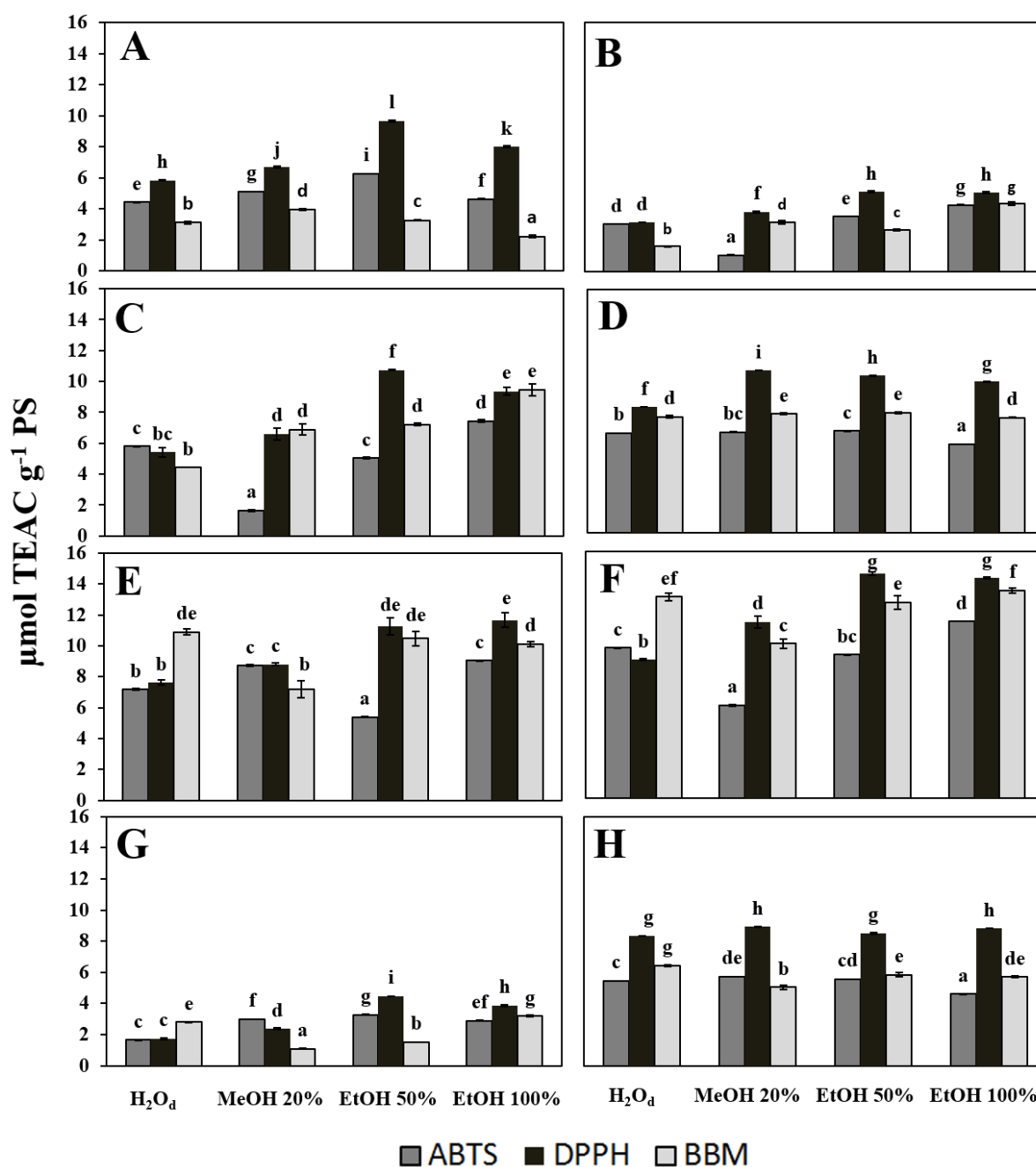


Figura 1.8. Capacidad antioxidante expresada como $\mu\text{mol TEAC g}^{-1} \text{PS}$ en las especies mediante los ensayos ABTS, DPPH y BBM usando diferentes solventes. (A) *Gelidium pusillum*; (B) *Gelidium corneum*; (C) *Porphyra umbilicalis*; (D) *Halopithys incurva*; (E) *Gracilariopsis longissima*; (F) *Hydropuntia cornea*; (G) *Ulva rotundata* and (H) *Lichina pygmaea*. Las diferentes letras indican diferencias significativas para los solventes y los métodos ($p < 0.05$).

El contenido de carbono fue significativamente diferente en las especies analizadas ($p < 0.01$), excepto para especies del género *Gelidium*. ($p > 0.05$). El contenido de carbono varió entre 22.2% en *U. rotundata* y 39% en el liquen marino *Lichina pygmaea*. También se encontraron valores de hasta el 30% en *G. pusillum*, *G. corneum*, *P. umbilicalis* y *G. longissima*. El contenido de nitrógeno (N) resultó

ser aún más heterogéneo ($p < 0.01$) que el de carbono. El nivel más alto se alcanzó en *L. pygmaea* (6.2%) seguido por las especies del género *Gelidium* (superior al 3.5%) (Tabla 1.2). *G. longissima* y *H. cornea* presentaron valores similares. Sin embargo, las especies con diferente contenido de C y N mostraron la misma relación C/N (Tabla 1.2). Se encontraron correlaciones significativas entre la relación C/N y la capacidad antioxidante para las 8 especies estudiadas y para los 3 métodos antioxidantes empleados. Los valores de r de Pearson fueron de 0.73, 0.71 y 0.75 para valores de p de 0.04, 0.05 y 0.03 en ABTS, DPPH y BBM respectivamente (ver Material Suplementario, Figura S.1.1 y Tabla S.1.1).

Los carbohidratos totales, expresados como porcentaje, mostraron el valor más alto en EtOH 50% y MeOH 20% (Tabla 1.3). En el último solvente, los extractos de *H. incurva* mostraron el mayor porcentaje de carbohidratos totales entre las algas estudiadas (16.1%), seguido de *G. longissima* (14.8%). Se observaron niveles de 4-6% en *G. corneum*, *P. umbilicalis* y *U. rotundata*, mientras que se detectaron niveles superiores al 6% en *G. pusillum* y *H. cornea*. En MeOH 20%, el nivel más bajo de carbohidratos totales se observó en *L. pygmaea* (3.28%).

El mayor contenido de lípidos se obtuvo con el solvente EtOH 50% para seis especies. El contenido de lípidos en *H. incurva* y *G. pusillum* no se pudo cuantificar como consecuencia de una alta interferencia entre el contenido fenólico y el método SPV (Sun et al. 1998). Los valores más altos (superiores al 5%) fueron encontrados para *P. umbilicalis* y *L. pygmaea*. Las otras algas presentaron valores entre 3.4 y 1.7% (Tabla 1.3). Por el contrario, en EtOH 100%, el contenido más bajo se obtuvo en *P. umbilicalis*.

Tabla 1.3. Carbohidratos totales y lípidos totales en base al peso seco (% en PS) para los diversos solventes y especies. Cada valor se representa como media \pm S.E. ($n = 3$). Las letras diferentes en la misma fila implican diferencias significativas entre los solventes para cada especie ($p < 0.05$).

Especies	Carbohidratos totales %				Lípidos totales %			
	H ₂ O	MeOH 20%	EtOH 50%	EtOH 100%	H ₂ O	MeOH 20%	EtOH 50%	EtOH 100%
<i>Gelidium pusillum</i>	5.4 \pm 0.4 ^b	7.4 \pm 0.3 ^c	5.8 \pm 0.7 ^b	1.4 \pm 0.2 ^a	n.p.q.	n.p.q.	n.p.q.	n.p.q.
<i>Gelidium corneum</i>	3.7 \pm 0.3 ^b	4.3 \pm 0.5 ^b	3.9 \pm 0.1 ^b	1.2 \pm 0.4 ^a	1.5 \pm 0.4 ^a	2.9 \pm 0.4 ^b	3.4 \pm 0.5 ^b	1.5 \pm 0.8 ^b
<i>Porphyra umbilicalis</i>	6.7 \pm 1.7 ^b	5.4 \pm 1.0 ^b	4.4 \pm 0.6 ^b	0.9 \pm 0.1 ^a	2.6 \pm 0.4 ^a	2.2 \pm 0.4 ^a	5.1 \pm 0.9 ^b	1.0 \pm 0.3 ^a
<i>Halopithys incurva</i>	7.1 \pm 3.7 ^a	16.1 \pm 3.3 ^b	6.6 \pm 3.3 ^a	8.5 \pm 0.9 ^a	n.p.q.	n.p.q.	n.p.q.	n.p.q.
<i>Gracilariopsis longissima</i>	4.5 \pm 0.3 ^b	14.8 \pm 1.5 ^c	5.6 \pm 0.9 ^b	0.9 \pm 0.1 ^a	1.8 \pm 0.6 ^a	5.6 \pm 1.2 ^b	2.0 \pm 0.7 ^a	2.0 \pm 0.1 ^a
<i>Hydropuntia cornea</i>	3.3 \pm 0.2 ^b	6.3 \pm 0.9 ^c	8.2 \pm 2.4 ^d	1.1 \pm 0.2 ^a	1.0 \pm 0.2 ^a	1.1 \pm 0.5 ^a	1.7 \pm 0.7 ^a	1.4 \pm 0.4 ^a
<i>Ulva rotundata</i>	4.5 \pm 1.0 ^b	4.3 \pm 0.2 ^b	4.8 \pm 0.4 ^b	1.3 \pm 0.2 ^a	3.3 \pm 0.3 ^a	2.7 \pm 0.3 ^a	4.4 \pm 0.6 ^a	4.4 \pm 0.9 ^a
<i>Lichina pygmaea</i>	3.5 \pm 0.3 ^b	3.3 \pm 0.1 ^b	3.9 \pm 0.4 ^b	0.9 \pm 0.1 ^a	2.5 \pm 0.5 ^a	2.5 \pm 0.4 ^a	5.0 \pm 0.9 ^b	1.1 \pm 0.2 ^a

n.p.q. No es posible cuantificar.

Los compuestos fenólicos, para tres de las ocho especies, el solvente MeOH 20% fue el más eficiente en la extracción de estos compuestos (Figura 1.9). Se encontraron diferencias significativas entre los solventes para todas las especies ($p < 0.01$), excepto en *L. pygmaea*. Los valores más altos de compuestos fenólicos se encontraron en *G. pusillum* (4.5-6 mg g⁻¹ PS) seguido de *L. pygmaea* (7 mg g⁻¹ PS), *H. incurva* (4.5 mg g⁻¹ PS) y *H. cornea* (3 mg g⁻¹ PS) en extractos de MeOH 20% (Figura 1.9). En las otras especies se obtuvieron valores cercanos o inferiores a 3 mg g⁻¹ PS.

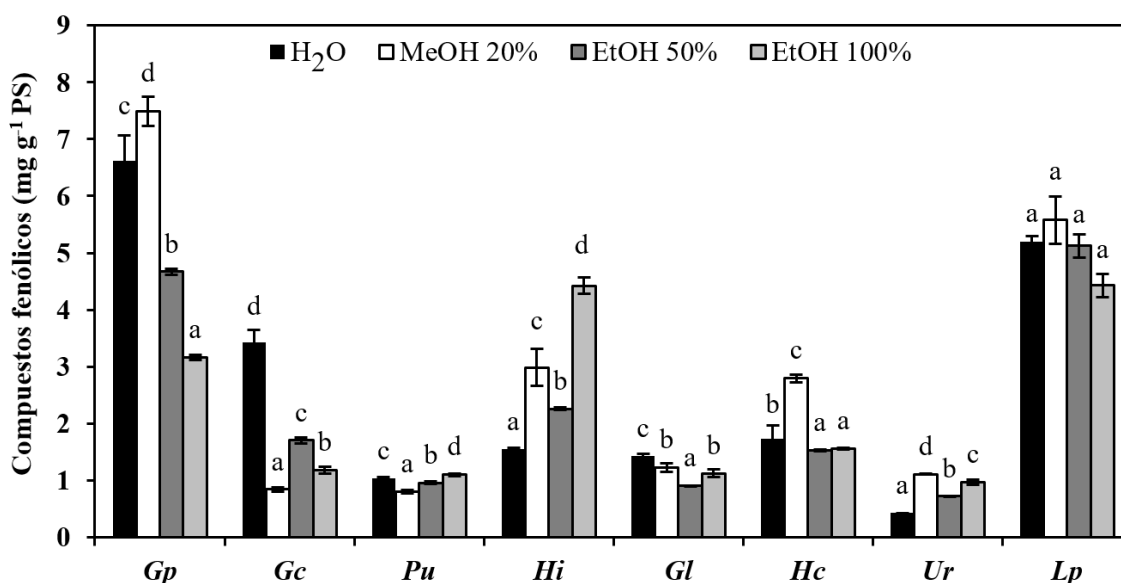


Figura 1.9. Compuestos fenólicos (mg g⁻¹ PS) en diferentes solventes para las especies *Gelidium pusillum* (Gp), *Gelidium corneum* (Gc), *Halopithys incurva* (Hi), *Gracilariopsis longissima* (Gl), *Hydropuntia cornea* (Hc), *Ulva rotundata* (Ur) y el liquen marino *Lichina pygmaea* (Lp). Las diferencias entre los solventes para cada especie, fueron indicadas por letras diferentes ($p < 0.05$). Los datos fueron expresados como media \pm S.E (n = 3).

La cantidad y composición de aminoácidos tipo micosporina (MAAs) fue significativamente diferente entre las especies estudiadas. Se detectaron seis MAAs diferentes: Micosporine-serinol, Palythine, Palythanol, Shinorine, Porphyra-334 y Asterina-330 en diferentes proporciones. Los últimos cinco MAAs sólo se encontraron en *G. pusillum* y *P. umbilicalis* mientras que Micosporine-serinol se cuantificó exclusivamente en *L. pygmaea* (Tabla 1.4). El contenido de MAAs totales en *G. pusillum* fue aproximadamente 1.7 veces mayor que en *G. corneum*. Para estos compuestos, no se encontraron diferencias significativas en términos de solvente empleado durante la extracción excepto para EtOH 100% donde el contenido de MAAs era mucho menor que para los demás solventes utilizados. El segundo MAA dominante fue el Palythanol detectado en todas las especies excepto en *L. pygmaea*. El aminoácido Palythine, se observó en todas las especies excepto en el liquen marino y en *G. longissima*. Porphyra-334 solo en tres de las especies (*G. pusillum*, *P. umbilicalis* y *H. cornea*). Finalmente, se detectó Asterina-330 en ambas especies del género *Gelidium* y en *P. umbilicalis*.

Tabla 1.4. Composición de aminoácidos tipo micosporina (MAAs) y MAAs totales (mg g⁻¹ PS) en diferentes especies y solventes. Los datos son expresados como media ± S.E (n = 3) (% PS). Las diferentes letras indican diferencias significativas entre los solventes para cada especie (p < 0.05).

MAAs								
Species	Solventes	Palythine %	Palythinol %	Shinorine %	Porphyra-334 %	Asterina-330 %	Mycosporine-serinol %	Total MAAs (mg g ⁻¹ PS)
<i>Gelidium pusillum</i>	H ₂ O	13.7 ± 1.0 ^a	44.7 ± 5.5 ^b	39.1 ± 4.1 ^a	0.2 ± 0.1 ^a	2.2 ± 0.4 ^a	n.f.	5.6 ± 0.6 ^b
	MeOH 20%	15.8 ± 3.5 ^a	52.9 ± 9.7 ^b	27.9 ± 14.1 ^a	0.3 ± 0.1 ^a	3.1 ± 0.9 ^a	n.f.	6.0 ± 1.0 ^b
	EtOH 50%	12.3 ± 1.2 ^a	49.8 ± 1.4 ^b	35.8 ± 0.3 ^a	0.2 ± 0 ^a	1.8 ± 0.2 ^a	n.f.	7.2 ± 0.6 ^b
	EtOH 100%	24.1 ± 2.4 ^b	9.4 ± 0.8 ^a	66.5 ± 2.3 ^b	n.f.	n.f.	n.f.	0.04 ± 0.001 ^a
<i>Gelidium corneum</i>	H ₂ O	12.0 ± 0.5 ^a	36.1 ± 2.5 ^{ab}	48.9 ± 1.9 ^a	n.f.	2.9 ± 0.1 ^a	n.f.	3.3 ± 0.5 ^b
	MeOH 20%	11.5 ± 0.5 ^a	42.9 ± 1.1 ^b	42.6 ± 1.6 ^a	n.f.	2.9 ± 0.2 ^a	n.f.	2.6 ± 0.0 ^b
	EtOH 50%	11.2 ± 1.2 ^a	44.7 ± 3.1 ^b	41.5 ± 2.7 ^a	n.f.	2.6 ± 0.3 ^a	n.f.	2.5 ± 0.5 ^b
	EtOH 100%	17.5±1.4 ^b	25.3 ± 7.4 ^a	48.0 ± 4.9 ^a	n.f.	9.2 ± 1.5 ^b	n.f.	0.02 ± 0.003 ^a
<i>Porphyra umbilicalis</i>	H ₂ O	0.2 ± 0.0 ^b	5.1 ± 0.4 ^a	20.3 ± 1.8 ^b	71.5 ± 2.2 ^b	2.9 ± 0.1 ^c	n.f.	2.0 ± 0.2 ^b
	MeOH 20%	0.1 ± 0.0 ^a	3.6 ± 0.3 ^a	49.6 ± 0.5 ^c	44.8 ± 0.6 ^a	1.9 ± 0.1 ^a	n.f.	2.6 ± 0.4 ^b
	EtOH 50%	0.2 ± 0.0 ^a	10.9 ± 2.2 ^b	18.4 ± 1.2 ^b	68.3 ± 3.4 ^b	2.3 ± 0.0 ^b	n.f.	2.2 ± 0.3 ^b
	EtOH 100%	n.f.	n.f.	10.1 ± 2.2 ^a	89.9 ± 2.2 ^c	n.f.	n.f.	0.011 ± 0.003 ^a
<i>Halophithys incurva</i>	H ₂ O	10.8 ± 9.0 ^a	50.3 ± 6.1 ^a	16.4 ± 8.8 ^a	22.5 ± 16.9 ^a	n.f.	n.f.	0.2 ± 0.1 ^a
	MeOH 20%	21.6 ± 10 ^a	38.1 ± 19.6 ^a	28.2 ± 12 ^a	n.f.	n.f.	n.f.	0.1 ± 0.0 ^a
	EtOH 50%	18.0 ± 8.1 ^a	64.4 ± 8.4 ^a	17.6 ± 6.5 ^a	n.f.	n.f.	n.f.	0.1 ± 0.0 ^a
	EtOH 100%	9.0 ± 2.1 ^a	58.7 ± 2.1 ^a	32.4 ± 4.2 ^a	n.f.	n.f.	n.f.	0.04 ± 0.01 ^a
<i>Gracilariopsis longissima</i>	H ₂ O	n.f.	72.2 ± 1.9 ^a	27.8 ± 1.9 ^a	n.f.	n.f.	n.f.	0.2 ± 0.1 ^a
	MeOH 20%	n.f.	69.1 ± 5.6 ^a	30.9 ± 5.6 ^a	n.f.	n.f.	n.f.	0.2 ± 0.1 ^a
	EtOH 50%	n.f.	62.8 ± 1.4 ^a	34.1 ± 3.7 ^a	n.f.	n.f.	n.f.	0.2 ± 0.1 ^a
	EtOH 100%	n.f.	100 ± 0.0 ^b	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	0.005 ± 0.0 ^a
<i>Hydropuntia cornea</i>	H ₂ O	4.3 ± 0.8 ^a	24.7 ± 6.3 ^a	23.8 ± 5.3 ^a	21.3 ± 13 ^a	n.f.	n.f.	0.3 ± 0.1 ^b
	MeOH 20%	9.7 ± 0.5 ^a	43.9 ± 5.2 ^a	35.9 ± 5.8 ^a	10.5 ± 0.1 ^a	n.f.	n.f.	0.2 ± 0.0 ^{ab}
	EtOH 50%	13.0 ± 3.2 ^a	44.6 ± 4.1 ^a	31.1 ± 5.6 ^a	11.3 ± 1.7 ^a	n.f.	n.f.	0.2 ± 0.0 ^{ab}
	EtOH 100%	54.8 ± 10.7 ^b	n.f.	45.2 ± 10.7 ^a	n.f.	n.f.	n.f.	0.003 ± 0.001 ^a
<i>Ulva rotundata</i>	H ₂ O	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.
	MeOH 20%	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.
	EtOH 50%	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.
	EtOH 100%	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.
<i>Lichina pygmaea</i>	H ₂ O	n.f.	n.f.	0.2 ± 0.0 ^a	n.f.	n.f.	99.8 ± 0.0 ^c	1.0 ± 0.1 ^b
	MeOH 20%	n.f.	n.f.	10.9 ± 0.8 ^b	n.f.	n.f.	89.1 ± 0.8 ^b	1.1 ± 0.1 ^b
	EtOH 50%	n.f.	n.f.	12.0 ± 0.1 ^b	n.f.	n.f.	88.0 ± 0.1 ^b	1.0 ± 0.1 ^b
	EtOH 100%	n.f.	n.f.	39.7 ± 3.1 ^c	n.f.	n.f.	60.3 ± 3.1 ^a	0.03 ± 0.004 ^a

n.f.: no encontrado.

La capacidad antioxidante en *G. pusillum* se correlacionó con el contenido de lípidos para el ensayo ABTS (p < 0.05; r = 0.98; n = 12) y el contenido de carbohidratos (p < 0.05, r = 0.98; n = 12) y con el aminoácido Asterina-330 (p < 0.05; r = 0.67; n = 9) para el método BBM. Sin embargo, en el

caso de *G. corneum*, la capacidad antioxidante estuvo relacionada, para el ensayo ABTS, con MAAs totales ($p < 0.01$; $r = 0.78$; $n = 12$). Para *P. umbilicalis*, la capacidad antioxidante se correlacionó con el contenido fenólico ($p < 0.01$; $r = 0.99$), con el aminoácido Shinorine ($p < 0.01$; $r = 0.83$; $n = 12$), el aminoácido Porphyrin-334 ($p < 0.01$; $R = 0.92$; $n = 12$) y con los MAAs totales ($p < 0.01$; $r = 0.91$; $n = 12$) para el método ABTS. En *H. incurva* y *U. rotundata*, el contenido fenólico se correlacionó positivamente con la capacidad antioxidante ($p < 0.01$; $r = 0.80$; $n = 12$ y $p < 0.01$; $r = 0.72$; $n = 12$ respectivamente). En *G. longissima*, la capacidad antioxidante cuantificada con el método BBM se correlacionó con los lípidos totales ($p < 0.01$; $r = 0.80$; $n = 12$). La capacidad antioxidante en *H. cornea* con el aminoácido Palythanol ($p < 0.05$; $r = 0.82$) para el método DPPH. Por último, la capacidad antioxidante en *L. pygmaea* se correlacionó con el contenido en compuestos fenólicos ($p < 0.05$; $r = 0.969$; $n = 12$) y carbohidratos totales ($p < 0.01$; $r = 0.89$; $n = 12$) para el ensayo ABTS. El aminoácido Shinorine ($p < 0.01$; $r = 0.80$; $n = 12$) se correlacionó con la actividad antioxidante (evaluado con el método DDPH).

Se encontró correlación entre la actividad antioxidante entre los tres métodos empleados: ABTS-DPPH ($p < 0.01$; $r = 0.86$; $n = 36$), ABTS-BBM ($p < 0.01$; $r = 0.83$; $n = 36$) y DPPH-BBM ($p < 0.01$; $r = 0.84$; $n = 36$) (ver Material suplementario Figura S.1.2 y Tabla S.1.2).

La cantidad de carbohidratos solubles se correlacionó con las actividades antioxidantes medidas con los ensayos de ABTS ($p < 0.01$; $r = 0.28$; $n = 96$) y DPPH ($p < 0.01$; $r = 0.30$; $n = 96$). El contenido de lípidos se relacionó con la actividad antioxidante para el método ABTS ($p < 0.01$; $r = 0.25$; $n = 96$) y para el método BBM ($p < 0.01$; $r = 0.99$; $n = 96$) en *G. longissima*.

El contenido de compuestos fenólicos, se correlacionó con los métodos ABTS ($p < 0.05$; $r = 0.21$; $n = 96$) y DPPH ($p < 0.01$; $r = 0.28$; $n = 96$). Finalmente, los niveles de MAAs totales también se correlacionaron con los métodos ABTS ($p < 0.05$; $r = 0.408$; $n = 36$) y DPPH ($p < 0.05$; $r = 0.431$; $n = 36$).

4. Discusión

En general, cabe destacar que para el solvente acuoso (H_2O), la capacidad antioxidante de los métodos DPPH y ABTS fue similar en el 55% de las especies estudiadas. Este resultado podría explicarse debido a que ambos métodos se rigen por el mismo mecanismo de acción. Entre estos dos ensayos antioxidantes, el solvente con mayor capacidad de extracción de antioxidantes fue el EtOH 50%, para el 44% y el 56% de las especies estudiadas, en los métodos ABTS y DPPH respectivamente. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Plaza et al. (2010). Sin embargo, para el método

BBM, el mejor solvente fue EtOH 100%, probablemente relacionado con el hecho de que este método es adecuado para la determinación de compuestos antioxidantes en un medio estrictamente lipofílico.

Otra diferencia importante entre los ensayos empleados, es que el radical ABTS puede solubilizarse tanto en solventes orgánicos como en solventes acuosos, por lo que se puede medir la actividad antioxidante considerando la naturaleza hidrofílica o lipofílica de los compuestos de la muestra (Wojdylo et al. 2007). Por el contrario, el radical DPPH sólo puede medirse en un medio orgánico, limitando la interpretación de la capacidad antioxidante de los compuestos hidrofílicos presentes en los extractos (Surveswaran et al. 2007). Por otra parte, no se descarta el sinergismo que pueda acontecer entre los diferentes compuestos en los extractos.

Para seleccionar una especie, es necesario desarrollar métodos de extracción apropiados, rápidos, rentables y respetuosos con el medio ambiente y que permitan aislar compuestos biológicamente activos sin que se originen una pérdida de la bioactividad. En numerosos estudios, los solventes más comunes para la extracción de antioxidantes incluyen agua, etanol, metanol y mezclas acuosas de los mismos (Alam et al. 2013). Éstos tienen buena polaridad y por lo tanto son favorables para ser utilizados para la extracción de compuestos polares como los compuestos fenólicos o MAAs entre otros. En última instancia, la polaridad del solvente, así como la técnica de extracción, tienen un efecto crítico sobre el rendimiento de extracción (López et al. 2011). El metanol, sin embargo, debería de ser descartado para aplicaciones en alimentos, cosméticos u otros productos destinados a consumo humano debido a su toxicidad.

Entre los ensayos utilizados en este estudio para el barrido de radicales, los métodos ABTS y DPPH son los más rápidos, simples (no incluyen muchos pasos) y tienen un menor coste en comparación con el método BBM. Por el contrario, el método BBM requiere muchos más reactivos, mucho más tiempo y más recursos técnicos para la realización del ensayo. Además, el resultado para el método BBM, sólo proporciona una visión de los antioxidantes que se encuentren en la matriz lipofílica. Por tanto, el ensayo ABTS es el único método evaluado en este estudio que es aplicable tanto a antioxidantes hidrofílicos como lipofílicos (Alam et al. 2013), por lo que su uso es justificado en otros estudios en los que se pretenda obtener una visión integrada del extracto. Se encontró una correlación positiva entre los métodos DPPH y ABTS, ABTS-BBM y DPPH-BBM. Floegel et al. (2011) también encontraron una correlación positiva entre los métodos DPPH y ABTS al igual que en este estudio. Esto se explica de acuerdo a que estos ensayos se fundamentan en el mismo mecanismo de reacción (en la transferencia de electrones), mientras que el método BBM se fundamenta en un mecanismo por transferencia de átomos de hidrógeno (Huang et al. 2005).

En nuestro estudio, en general, la actividad antioxidante entre las macroalgas y el líquen marino analizados fue alta (5-15 $\mu\text{mol TEAC g}^{-1}$ PS) en comparación con los resultados publicados en

otros estudios para varias microalgas (7-11 $\mu\text{mol TEAC g}^{-1}$ PS) y otras macroalgas (1.6-2.2 $\mu\text{mol TEAC g}^{-1}$ PS) (Matanjun et al. 2008). Esto podría ser explicado debido a que la mayoría de las especies analizadas en otros estudios se someten a diferentes estresores en el sistema de cultivo. El aumento del estrés provoca una regulación de las sustancias antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas (Stengel et al. 2011). Acerca del efecto del tipo de solvente en la actividad antioxidante, Yuan et al. (2005) estimaron la actividad antioxidante relacionada con los compuestos fenólicos de *Palmaria palmata*, obteniendo niveles más altos de estas sustancias usando metanol como extractor. Los componentes hidrofílicos se extraen con solventes polares como H_2O , seguido de metanol o etanol. O'Sullivan et al. (2011), utilizaron metanol y agua para extraer compuestos bioactivos (antioxidantes) de diferentes algas pardas, siendo el género *Fucus* el que presentó mayor actividad antioxidante. Los resultados de este estudio concuerdan con los resultados encontrados por Sarikurkcu et al. (2009) en extractos de plantas terrestres, en los que se observó una fuerte correlación entre la polaridad de los extractos y su potencial antioxidante. Los extractos más polares mostraron el mayor potencial para la neutralización de radicales libres.

Desde un punto de vista biotecnológico, para tener una alta producción, lo idóneo es que las especies potencialmente cultivables presenten bajos niveles de agua y altos niveles de materia orgánica. Las algas rojas analizadas en este trabajo presentaron niveles mucho más altos de agua interna y menor materia orgánica que *L. pygmaea* y *U. rotundata* (Chlorophyta). Estas dos especies presentaron bajos niveles de agua interna en cuanto a la relación PF/PS. Otros autores reportaron un porcentaje similar de agua en las especies de *Ulva* (78-80%) en comparación con las macroalgas rojas (72-85%). Esto depende de las características propias de la especie, así como de la zona que ocupen en el ecosistema. El contenido de cenizas y de materia orgánica en las diferentes especies obtenidas del entorno natural, es dependiente también, del phylum, del origen geográfico y de las variables estacionales, ambientales y fisiológicas en el que se encuentren. En cualquier caso, los minerales contenidos en la ceniza de algas, también presentan interés desde el punto de vista nutricional.

La extracción de compuestos biológicamente activos de la biomasa de algas no es selectiva. El extracto en su conjunto, es una mezcla de diferentes compuestos. Los factores que influyen en la composición y la actividad de los extractos de algas dependen de las especies empleadas, de las condiciones ambientales donde se recolectaron, de la estacionalidad, de la edad de los especímenes, de la ubicación geográfica y las tecnologías de extracción empleadas entre otros (Kadam et al. 2013). El estrés ambiental al que están sometidas las algas, como son la irradiancia, la temperatura, la desecación, el estrés osmótico, etc., conduce a la formación de radicales libres y agentes oxidantes que pueden provocar daño fotodinámico (Gupta & Abu-Ghannam 2011). Debido a esto, las algas sintetizan una gran variedad de compuestos de diferente naturaleza con la finalidad de contrarrestar los efectos oxidativos.

Las macroalgas marinas son una fuente de compuestos bioactivos con diferentes actividades biológicas que habitualmente no se encuentran en plantas terrestres. Las algas contienen polisacáridos (polímeros de monosacáridos unidos entre sí por enlaces glicosídicos) con numerosas aplicaciones biotecnológicas en productos como estabilizantes, espesantes, emulsionantes, alimentos, bebidas, etc. Las concentraciones totales de carbohidratos en las especies de algas marinas de interés oscilan entre el 4% y el 76% del peso seco. Los carbohidratos pueden separarse químicamente en fracciones solubles e insolubles. La cantidad de carbohidratos solubles varía entre los taxones, siendo más alta en las algas rojas. De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, las dos especies que mostraron los mayores valores de carbohidratos son *G. longissima* y *H. incurva* con valores de 16.1% y 14.8% respectivamente en MeOH 20%. Estas especies han demostrado una alta tasa de crecimiento en sistemas de Acuicultura Multitrófica Integrada. En cultivos a una densidad de 6 g PF L⁻¹, se encontró una alta producción de biomasa en *H. cornea* (22-29 g de PS m⁻² d⁻¹) (Viera et al. 2011). También se observó una tasa de crecimiento de entre el 10-16 % d⁻¹ para *G. longissima* y *H. incurva* (Robledo et al. 2014). *G. longissima* también ha sido cultivada en sistemas de acuicultura extensiva en tanques y mostrando un crecimiento del 9% d⁻¹ (Hernández et al. 2006). Por último, *H. incurva* también se ha cultivado en efluentes de piscifactoría a una densidad de 8 g PF L⁻¹ con una producción de aproximadamente 5 g de PS m⁻² d⁻¹ y una eficiencia de asimilación de N de 90-99% a una densidad de cultivo de 6 g PF L⁻¹. La productividad promedio de la biomasa en los distintos tratamientos fue de 16-19 g PS m⁻² d⁻¹ (Viera et al. 2011).

Se detectaron compuestos fenólicos en todas las especies analizadas, siendo mayor en las algas rojas *G. pusillum* y *H. incurva* y también en el liquen marino respecto a las otras especies. El nivel más bajo de compuestos fenólicos se encontró en la alga verde *U. rotundata*. En el 44% de las especies estudiadas, el solvente MeOH 20%, fue el más eficiente para la extracción de estas sustancias. Esto coincide con los resultados obtenidos por otros autores (López et al. 2011) donde describieron una extracción más eficiente en metanol o etanol que en agua. Sin embargo, en otros estudios, el extracto obtenido con el solvente H₂O para el alga parda *Stypocaulon scoparium* mostró el mayor contenido fenólico en comparación con los solventes MeOH 50%, MeOH 100% y EtOH 100%, López et al. (2011) afirmaron que los niveles de compuestos fenólicos pueden variar hasta tres veces dependiendo del método de extracción utilizado. En este estudio, el contenido de compuestos fenólicos en algunas de las algas rojas y en el liquen (*L. pygmaea*) estudiados, es tan alto como en macroalgas pardas, el grupo de macroalgas con el mayor nivel reportado de compuestos fenólicos (Stengel et al. 2011). Por ejemplo, el contenido de compuestos fenólicos en los diferentes solventes se encontró entre 3.2-8.0 para *G. pusillum*, 1.5-4.9 para *H. incurva*, 1.5-3.0 para *H. cornea* y 4.4-6 mg g⁻¹ PS para *L. pygmaea*. El alto nivel de compuestos fenólicos en *H. incurva* ya ha sido reportado previamente por Güenaga (2011). Además, se han detectado compuestos fenólicos sulfatados y bromados en varias especies de macroalgas rojas (Zhao et al. 2004). Entre las macroalgas, la división Rhodophyta es la que posee la

mayor abundancia de compuestos fenólicos halogenados (bromados y clorados fundamentalmente) con probados efectos antioxidantes, antimicrobianos, anticancerígenos, antidiabéticos y antitrombóticos. En *Gracilaria birdiae*, cuantificaron el contenido fenólico alrededor de 1.1 mg GAE (equivalentes de ácido gálico) g PS⁻¹ (Souza et al. 2011) y *H. cornea*, estos autores encontraron alrededor de 0.88 mg GAE g PS⁻¹. En *Porphyra* sp. y en *Eucheuma cottoni*, Kuda et al. (2005) reportaron 22.5 y 20 mg g⁻¹ de FGE (equivalentes de floroglucinol) respectivamente. También, para *G. tenuifrons*, se encontraron valores de 9.41 mg g⁻¹ CE (equivalentes de catequina) para los compuestos fenólicos extraídos con solventes metanólicos (Zubia et al. 2014).

Los espectros de absorción de los extractos, presentaron picos característicos en la región UVB (310 nm) y UVA (330-334 nm) (datos no mostrados). Estos intervalos espectrales corresponden a la absorción por moléculas fotoprotectoras (MAAs) presentes en algunos organismos marinos, como las algas rojas y los líquenes de este estudio. En *U. rotundata* no se encontró ninguna absorción en este rango espectral y no se detectaron MAAs por HPLC. La absorción máxima a 310 nm en los extractos de *L. pygmaea* corresponde al oxo-MAA (Micosporine-serinol), mientras que los picos de absorción con un máximo de alrededor de 320-334 nm están relacionados con imino-MAA de algas rojas (Palythine, Palythanol, Shinorine, Porphyra -334 y Asterina-330).

En nuestro estudio, *G. pusillum* y *G. corneum* presentaron Palythanol y Shinorine como MAAs principales. En general, para todas las especies estudiadas, el contenido de MAAs usando EtOH 100% como solvente, fue mucho menor que para otros solventes. Esto puede explicarse debido a la menor polaridad del etanol para interactuar con la parte hidrofóbica de aminoácidos y péptidos. Los MAAs pueden diferir entre las especies debido a las condiciones ambientales en las que se encuentren (UVR, disponibilidad de N, etc.). El contenido de MAAs totales en *G. pusillum* fue aproximadamente 1.7 veces mayor que el de *G. corneum* debido a que *G. pusillum* se ubica en la parte superior de la zona intermareal en comparación con *G. corneum* que se sitúa en la parte inferior y en zonas submareales, por lo tanto, la irradiancia diaria integrada en el sitio de crecimiento de *G. pusillum* es superior a la de *G. corneum* (Figuerola & Gómez 2001). Los MAAs están regulados tanto por la irradiancia como por la calidad lumínica, pero también por la disponibilidad de N (Barufi et al. 2011). Torres et al. (2015) encontraron cuatro MAAs (Asterina-330, Palythanol, Palitene y Usijerene) en *Gracilariopsis tenuifrons* después realizar una extracción etanólica, mientras que en este estudio se encontró sólo Palythanol en *G. longissima*, pero además Shinorine usando MeOH 20% o EtOH 50%. El bajo rendimiento de extracción encontrado usando etanol como solvente podría explicar este resultado. Probablemente Shinorine se encontró en trazas fuera del intervalo detección del HPLC.

La relación C/N se utiliza como indicador del estado nutricional. Por lo tanto, bajo recursos limitados de nutrientes (especialmente N), el crecimiento se ve restringido en los organismos

fotosintéticos, lo que genera un aumento en la relación C/N. Este aumento está relacionado con la activación y producción de metabolitos secundarios (Bryant et al. 2012). Por lo tanto, la relación C/N es un buen indicador para estimar tanto el estado óptimo nutricional de los organismos fotosintéticos, como el aumento en la producción de metabolitos secundarios.

En relación con el contenido de compuestos antioxidantes, Ibrahim & Jaafar (2011) encontraron en plantas terrestres, que la baja disponibilidad de N y por lo tanto, altos niveles de C/N, están relacionados con la acumulación de metabolitos secundarios involucrados en la capacidad antioxidante. Estos resultados concuerdan con lo observado en este estudio, donde especies con una alta relación C/N presentan mayores valores de actividad antioxidante total, evaluados mediante los métodos ABTS, DPPH y BBM. Por lo tanto, en este estudio, se demuestra por primera vez en algas que, altos valores de C/N, redundan en valores más altos de compuestos antioxidantes.

5. Conclusiones

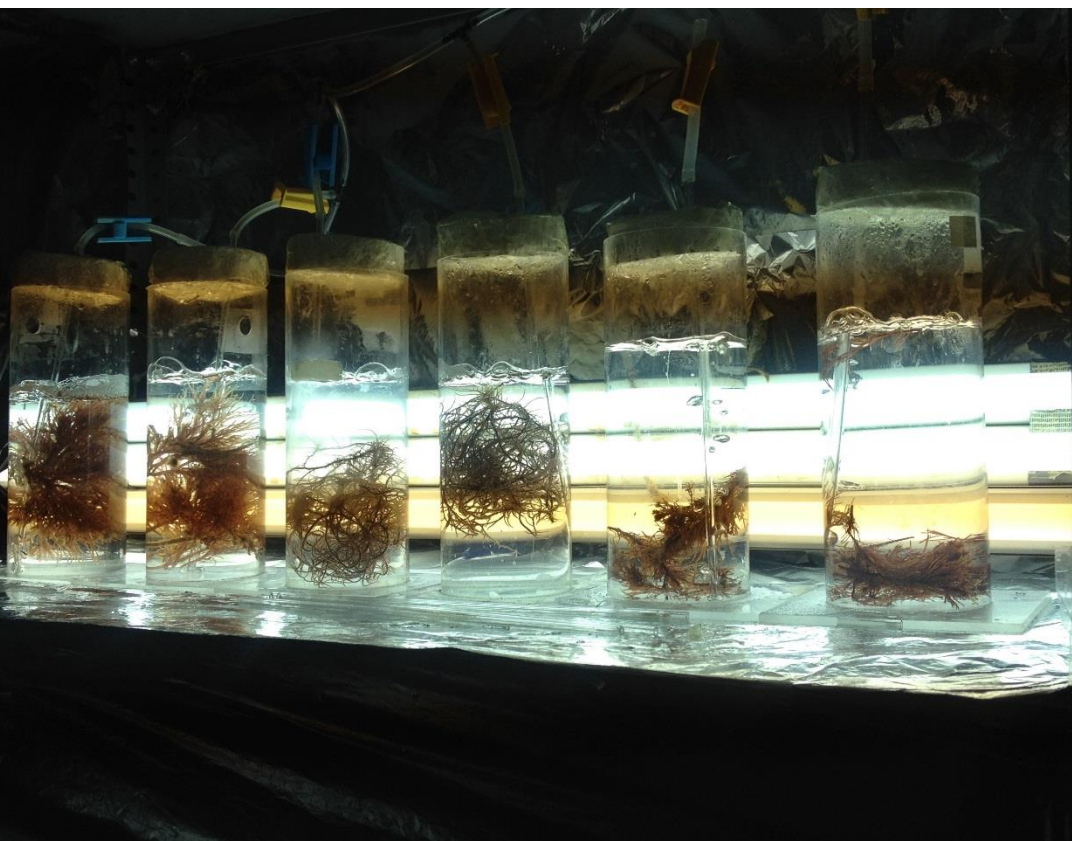
En conclusión, las dos especies de este estudio con mayor capacidad antioxidante y moléculas con potencial interés biotecnológico fueron *G. longissima* y *H. cornea*. *H. incurva*, es otra especie interesante debido al alto nivel de compuestos fenólicos que presenta y debido a que anteriormente ya se ha logrado cultivar con éxito (Güenaga 2011). Por otro lado, *G. pusillum*, es también un especie de alga roja con altos niveles de MAAs y compuestos fenólicos pero actualmente no existen técnicas que permitan su cultivo. Numerosos estudios han demostrado que las dos primeras especies poseen una alta capacidad de crecimiento en sistemas de biofiltración de efluentes nitrogenados (Figuerola et al. 2012), por lo que su cultivo sería económicamente viable y ambientalmente sostenible.

Se propone como solvente más adecuado para estos fines biotecnológicos el etanol (EtOH 50%), siendo este un solvente orgánico con baja toxicidad y con un bajo precio en el mercado actual. Este solvente podría ser empleado para la extracción de compuestos antioxidantes al no presentar problemas toxicológicos en las futuras aplicaciones que se deriven de los extractos. El método ABTS se propone para la determinación de la capacidad antioxidante de los extractos algales, ya que es un ensayo fácil, rápido y económico, y que además, proporciona una visión integradora del extracto tanto en medio lipofílico como en medio hidrofílico.

Con el fin de comprender mejor los mecanismos subyacentes a los efectos antioxidantes en las algas, es necesario estudiar la relación estructura-actividad y las sinergias puedan acontecer entre los componentes, la purificación y el análisis estructural de moléculas potencialmente antioxidantes, así como el desarrollo de nuevas técnicas extracción y purificación

Capítulo 2

Efectos de la radiación UV en la fotosíntesis, la capacidad antioxidante y en la acumulación de compuestos bioactivos en *Gracilariopsis longissima*, *Hydropuntia cornea* y *Halopithys incurva* (Rhodophyta)





Efectos de la radiación UV en la fotosíntesis, la capacidad antioxidante y en la acumulación de compuestos bioactivos 2

en *Gracilariopsis longissima*, *Hydropuntia cornea* y *Halopithys incurva* (Rhodophyta)

1. Resumen

En este capítulo, tres de las especies de algas rojas estudiadas en el **Capítulo 1** con mayor capacidad antioxidante, *H. cornea*, *G. longissima* y *H. incurva*, fueron cultivadas durante 14 días en el laboratorio en agua de mar enriquecida con alto contenido de nutrientes (NH_4^+ y PO_4^{3-} , 150 y 15 μM , respectivamente) y con dos niveles de radiación: PAR ($\lambda = 400\text{-}700\text{ nm}$) y PAB (PAR + UVB + UVA, $\lambda = 280\text{-}700\text{ nm}$). Se estudiaron los efectos del tipo de radiación bajo alta disponibilidad de N-NH_4^+ sobre el crecimiento, los pigmentos fotosintéticos (clorofila *a*, carotenoides y ficobiliproteínas), la actividad fotosintética y la composición bioquímica. No se encontraron diferencias significativas en el rendimiento máximo (F_v/F_m) durante todo el tiempo experimental entre los tratamientos PAR y PAB. Sin embargo, la tasa de transporte electrónico máximo (ETR_{max}) aumentó a lo largo del tiempo encontrándose los valores más altos en PAR que en PAB para *H. incurva* y en *H. cornea*, mientras que en *G. longissima* ocurrió justo lo contrario. La eficiencia fotosintética (α_{ETR}) disminuyó con el tiempo en las dos primeras especies, pero en *G. longissima* aumentó. La irradiancia de saturación (Ek_{ETR}) y el amortiguamiento no fotoquímico máximo (NPQ_{max}) aumentaron en PAB con el tiempo hasta un 80% y 30%, respectivamente, lo que indica una aclimatación fotosintética como la de algas “tipo sol”. En las tres especies, el contenido de clorofila *a* (Chla), carotenoides y ficobiliproteínas (FE + FC), así como el contenido en N interno aumentaron en PAB tras 14 días de cultivo. Se identificaron en todas las especies cinco MAAs mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). El contenido total de MAAs aumentó a lo largo del tiempo, siendo un 30% mayor en *H. incurva*, un 40% en *G. longissima* y un 50% en *H. cornea* en PAB respecto a PAR. Por último, la actividad antioxidante también aumentó con el tratamiento PAB. Todas las especies presentaron un mecanismo eficaz de fotoprotección basado en la acumulación de compuestos fotoprotectores con actividad antioxidante, así como en una alta disipación de la energía de excitación (mayor NPQ_{max}).

2. Diseño experimental

Gracilariopsis longissima (Gl), *Halopithys incurva* (Hi) e *Hydropuntia cornea* (Hc) se mantuvieron en medio Provasoli (Provasoli et al. 1957), modificado por Bold & Wynne (1978) hasta el inicio del experimento. Las algas, una vez recolectadas del medio natural y a partir de los cultivos en tanques de 800-1000 L del Banco Español de Algas (BEA) para el caso de *Hydropuntia cornea*, se colocaron en medio de cultivo Provasoli tal como se describe más detalladamente en “Material y métodos generales, Tabla M.2”. Siete días antes del comienzo del experimento, las diferentes especies se colocaron en agua de mar, sin ninguna adición de nutrientes con la finalidad de agotar las reservas de N, y en recipientes (cilindros) transparente a la UVR fabricados con metacrilato de polivinilo transparentes a la UVR (Plexi-vidrio XT- 29080, ver espectros de transmisión en “Material y métodos generales, Ep. 1.1.1”). Los cilindros fueron llenados con un volumen final de 1.5 L de agua de mar (18 cilindros para las tres especies; 3 réplicas por tratamiento y especie). Los tratamientos lumínicos fueron radiación PAB (PAR + UVA + UVB) y radiación PAR. El fotoperiodo fue de 16:8 (luz: oscuridad) y las irradiancias empleadas fueron de 12.7 W m⁻² para UVA, 0.6 W m⁻² para UVB y 150 μmol m⁻² s⁻¹ para PAR (más detalles, ver tratamiento lumínico en “Material y métodos generales, Tabla M.1”). Las especies fueron cultivadas en condiciones de alto N y P (150 μM de NH₄⁺ y 15 μM de PO₄³⁻, relación N/P = 10) durante 14 días emulando las condiciones nutritivas de efluentes de piscifactoría.

La actividad fotosintética se estimó cada 4 días, mediante la fluorescencia *in vivo* de la clorofila *a* asociada al fotosistema II (PSII) y se pesó la biomasa para la determinación de la productividad de la biomasa (g PS m⁻² d⁻¹) y la tasa de crecimiento (% día⁻¹). La biomasa excedente tras el ajuste a la densidad de biomasa experimental (9 g PF L⁻¹), se almacenó a -80 °C hasta la realización de los análisis químicos.

3. Resultados

3.1. Morfología

Las especies *Hydropuntia cornea*, *Gracilariopsis longissima* y *Halopithys incurva* presentaron al final del experimento, ramificaciones típicas pigmentadas de color rojizo mostrando algunos cambios morfológicos o estructurales respecto al inicio del experimento (Figura 2.1). Después del período experimental, las especies cultivadas en PAB mostraron cambios pigmentarios notables asociados a reducción en el contenido de ficobiliproteínas (Tabla 2.1). Sin embargo, en el tratamiento PAR, las especies se encontraron más pigmentadas y los talos presentan nuevas ramificaciones, por lo tanto resultando en cambios estructurales (Figura 2.1) y con niveles de ficobiliproteínas más altos que en PAB en *H. cornea* pero similares en las otras dos especies (Tabla 2.1). La conductividad media del

agua de mar durante el experimento fue de $54.3 \pm 4.2 \text{ mS cm}^{-2}$, la salinidad 37.1 g L^{-1} , la temperatura media de $24.6 \pm 1.5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y el pH de 7.9 ± 0.2 . Cada dos días se cambió el agua reponiendo los nutrientes a las concentraciones experimentales.

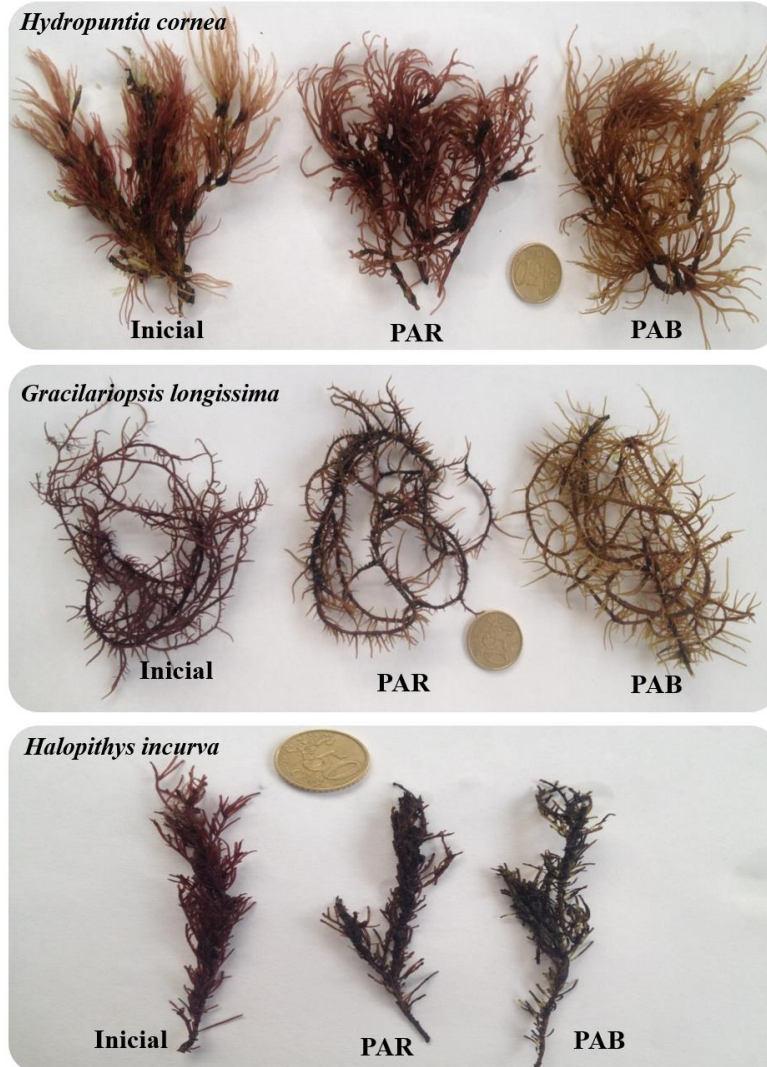


Figura 2.1. Morfología y coloración de *Hydropuntia cornea*, *Gracilariopsis longissima* y *Halopithys incurva* al comienzo del experimento (inicial) y a los 14 días bajo radiación PAR y PAB.

3.2. Pigmentación

Con respecto a la composición pigmentaria, el principal pigmento fotosintético (Chla) resultó afectado de manera interactiva en el tiempo (T) y en la Luz (L) en las especies *H. cornea* y *G. longissima* ($p < 0.01$). En *H. incurva* solo hubo cambios en este pigmento en relación al tiempo (T) ($p < 0.05$), incrementándose la concentración de Chla a lo largo del periodo experimental. Por el contrario, únicamente *H. incurva* mostró interacción significativa en T x L en el contenido de carotenoides ($p < 0.01$) y en *G. longissima* los cambios observados dependieron únicamente del tratamiento lumínico (L) ($p < 0.05$), siendo la concentración de Chla mayor en PAB que en PAR. En

cuanto al contenido en ficobiliproteínas, en *G. longissima* se observaron efectos interactivos solo para la FC ($p < 0.01$). En *H. incurva*, tanto FC como la ficoeritrina (FE), se vieron afectadas solo por T, a un nivel de significancia de $p < 0.01$ y $p < 0.05$, respectivamente, siendo el contenido de FC significativamente mayor al final del experimento (14 días). En *H. cornea* no se detectaron cambios en ninguna de las variables independientes analizadas en este estudio (Tabla 2).

Tabla 2.1. Composición de pigmentos fotosintéticos: clorofila *a* (Chla), carotenoides totales (Car), ficocianina (FC) y ficoeritrina (FE), expresados en mg g⁻¹ PS para *H. cornea* (Hc), *G. longissima* (Gl) y *H. incurva* (Hi) en el momento inicial y después de 4, 8 y 14 d de cultivo bajo los tratamientos PAR y PAB. Diferentes letras (minúsculas en *H. cornea*, mayúsculas en *G. longissima* y cursivas en *H. incurva*) indican la interacción Tiempo x Luz (T x L) para cada especie de forma independiente (Media \pm S.E.; n = 3).

Especie	Tiempo	Luz	Chla	Car	FE	FC
<i>Hc</i>	Inicial		0.91 \pm 0.02	0.25 \pm 0.02	0.79 \pm 0.18	0.16 \pm 0.02
	4	PAR	0.97 \pm 0.03 ^a	0.21 \pm 0.02	0.95 \pm 0.18	0.21 \pm 0.03
		PAB	0.76 \pm 0.03 ^c	0.26 \pm 0.01	0.46 \pm 0.06	0.11 \pm 0.02
	8	PAR	0.54 \pm 0.01 ^b	0.18 \pm 0.03	0.61 \pm 0.13	0.19 \pm 0.02
		PAB	0.88 \pm 0.02 ^a	0.3 \pm 0.02	0.49 \pm 0.09	0.16 \pm 0.02
	14	PAR	0.93 \pm 0.03 ^a	0.2 \pm 0.02	1.33 \pm 0.08	0.36 \pm 0.02
		PAB	0.9 \pm 0.03 ^a	0.27 \pm 0.03	0.82 \pm 0.13	0.24 \pm 0.04
	Inicial		0.51 \pm 0.03	0.15 \pm 0.01	2.63 \pm 0.42	1.4 \pm 0.06
	4	PAR	0.73 \pm 0.03 ^A	0.2 \pm 0.02	2.63 \pm 0.43	1.44 \pm 0.06 ^C
		PAB	0.63 \pm 0.02 ^A	0.25 \pm 0.01	1.56 \pm 0.4	0.52 \pm 0.08 ^A
<i>Gl</i>	8	PAR	0.69 \pm 0.02 ^{AB}	0.23 \pm 0.01	1.8 \pm 0.19	0.78 \pm 0.09 ^B
		PAB	0.68 \pm 0.03 ^A	0.31 \pm 0.02	1.21 \pm 0.11	0.52 \pm 0.05 ^A
	14	PAR	0.57 \pm 0.02 ^A	0.25 \pm 0.01	1.96 \pm 0.17	0.82 \pm 0.04 ^B
		PAB	0.66 \pm 0.03 ^{AB}	0.31 \pm 0.02	1.67 \pm 0.13	1.3 \pm 0.08 ^C
	inicial		0.41 \pm 0.04	0.22 \pm 0.02	1.99 \pm 0.11	0.21 \pm 0.02
	4	PAR	0.28 \pm 0.02	0.19 \pm 0.01 ^{d'}	1.55 \pm 0.29	0.25 \pm 0.03
		PAB	0.3 \pm 0.03	0.26 \pm 0.01 ^{ab'}	1.95 \pm 0.31	0.26 \pm 0.06
	8	PAR	0.4 \pm 0.02	0.28 \pm 0.01 ^{a'}	1.09 \pm 0.3	0.24 \pm 0.04
		PAB	0.31 \pm 0.01	0.24 \pm 0.01 ^{b'}	1.02 \pm 0.24	0.27 \pm 0.02
	14	PAR	0.52 \pm 0.02	0.3 \pm 0.02 ^{ac'}	2.41 \pm 0.3	0.44 \pm 0.04
		PAB	0.49 \pm 0.01	0.32 \pm 0.01 ^{c'}	2.37 \pm 0.47	0.44 \pm 0.08

3.3. Actividad fotosintética

El rendimiento cuántico máximo (F_v/F_m) no se afectó por ninguna variable a lo largo del experimento en ninguna de las tres especies de este estudio, tampoco se observó interacción significativa entre los factores T x L (Figura. 2.2A). La tasa de transporte electrónico como indicador de la producción fotosintética (ETR_{max}) se afectó por la interacción de T x L en *H. cornea* ($p < 0.01$) y en *H. incurva* ($p < 0.01$). En cambio, en *G. longissima*, no se observó dicha interacción, pero sí se observó cambios en T y L de manera independiente ($p < 0.05$) aumentando los valores de ETR_{max} con

respecto al tiempo en ambos tratamientos lumínicos (Figura. 2.2B). El amortiguamiento no fotoquímico (NPQ_{max}) no resultó afectado por la interacción de T x L en las especies *H. cornea* y *G. longissima*, pero si en *H. incurva* ($p < 0.05$), siendo ligeramente más alto en el tratamiento PAR que en PAB (Figura. 2.2C). Bajo UVR (PAB), la relación ETR_{max}/NPQ_{max} en *H. incurva* fue aproximadamente 9.2 veces más alta que en condiciones iniciales, mientras que en *H. cornea* y *G. longissima* fue sólo 4.6 y 3.6 veces más, respectivamente (D).

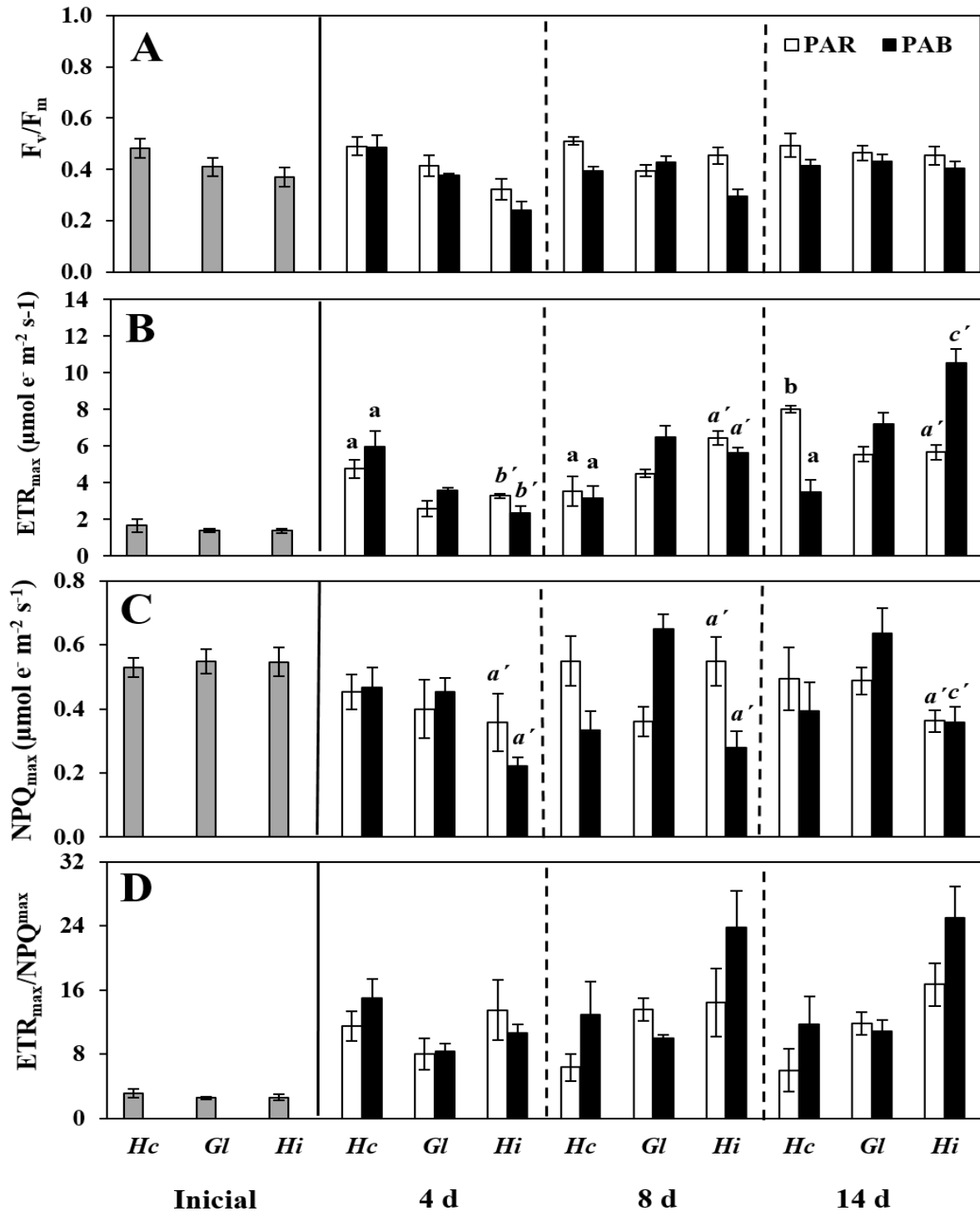


Figura 2.2. Parámetros fotosintéticos en *H. cornea* (*Hc*), *G. longissima* (*Gl*) y *H. incurva* (*Hi*) en el momento inicial y después de 4, 8 y 14 d de cultivo bajo los tratamientos PAR y PAB. Rendimiento cuántico máximo como F_v/F_m (A), Tasa de transporte electrónico máximo como ETR_{max} (B), amortiguamiento no fotoquímico como NPQ_{max} (C) y relación entre ETR_{max}/NPQ_{max} (D). Diferentes letras (minúsculas en *H. cornea*, mayúsculas en *G. longissima* y cursivas en *H. incurva*) indican diferencias significativas para la interacción Tiempo x Luz (T x L) en cada especie de forma independiente (Media \pm SE; n = 3).

La eficiencia fotosintética α_{ETR} resultó estar influenciada en las especies *H. cornea* y *H. incurva*, por la interacción factorial entre T x L ($p < 0.01$). Sin embargo, en *G. longissima*, no se observaron efectos significativos de estas variables mostrando valores más altos en PAB que en PAR para los días 8 y 14. En cuanto a la irradiancia de saturación de la fotosíntesis ($E_{k_{ETR}}$), solo en *H. incurva* se observaron efectos interactivos en T x L ($p < 0.05$). Por último, para la irradiancia óptima (I_m), exclusivamente en *H. cornea* resultó influenciada interactivamente en T x L ($p < 0.05$). En las especies *G. longissima* y *H. incurva* no se observaron cambios significativos para la I_m , aunque se observaron valores más altos en PAB que en PAR en ambas especies (Tabla 2.2).

Tabla 2.2. Parámetros fotosintéticos: eficiencia fotosintética (α_{ETR}), irradiancia de saturación de la fotosíntesis ($E_{k_{ETR}}$), e irradiancia óptima (I_m) en *H. cornea* (*Hc*), *G. longissima* (*Gl*) y *H. incurva* (*Hi*) en el momento inicial y después de 4, 8 y 14 d de cultivo bajo los tratamientos PAR y PAB. Diferentes letras (minúsculas en *H. cornea*, mayúsculas en *G. longissima* y cursivas en *H. incurva*) indican diferencias significativas para la interacción Tiempo x Luz (T x L) en cada especie de forma independiente (Media \pm S.E.; n = 3).

Especie	Tiempo (días)	Luz	α_{ETR}	$E_{k_{ETR}}$	I_m
<i>Hc</i>	Inicial		0.025 ± 0.003	70.9 ± 15.9	310.6 ± 21.2
	4	PAR	0.025 ± 0.003 ^a	202.9 ± 19.1	841.2 ± 38.8 ^b
		PAB	0.03 ± 0.003 ^a	209.1 ± 17.5	561.3 ± 79.6 ^a
	8	PAR	0.025 ± 0.004 ^a	205.1 ± 26.1	539.3 ± 104.2 ^a
		PAB	0.024 ± 0.003 ^a	129.2 ± 15.6	303.3 ± 61 ^a
	14	PAR	0.038 ± 0.005 ^b	183.6 ± 22.2	337 ± 77.1 ^a
		PAB	0.016 ± 0.003 ^a	184.2 ± 27.7	543.4 ± 110.6 ^a
	<i>Gl</i>	Inicial		0.018 ± 0.001	75.1 ± 5.2
4		PAR	0.026 ± 0.003	99.9 ± 15.4	326.2 ± 76.9
		PAB	0.024 ± 0.001	151.4 ± 8.3	423.7 ± 28.1
8		PAR	0.025 ± 0.002	185.5 ± 9.7	546.3 ± 67.1
		PAB	0.033 ± 0.003	193.5 ± 9.6	486.7 ± 33.6
14		PAR	0.037 ± 0.002	152.2 ± 5.6	379.9 ± 20.7
		PAB	0.042 ± 0.005	180 ± 13.8	429.7 ± 38.6
<i>Hi</i>		inicial		0.038 ± 0.005	37.5 ± 4.1
	4	PAR	0.039 ± 0.004 ^{a'}	85.7 ± 5.4 ^{b'}	413.7 ± 103.7
		PAB	0.028 ± 0.005 ^{a'}	100.1 ± 16.6 ^{a'}	377.8 ± 53.6
	8	PAR	0.05 ± 0.006 ^{b'}	136.5 ± 17.4 ^{a'}	388.2 ± 41
		PAB	0.028 ± 0.002 ^{a'}	203.9 ± 7.5 ^{c'}	609.7 ± 68.1
	14	PAR	0.039 ± 0.003 ^{a'}	146.4 ± 7 ^{a'}	400.1 ± 29.6
		PAB	0.044 ± 0.003 ^{b'}	243 ± 18.7 ^{c'}	640.8 ± 48.9

3.4. Productividad de la biomasa, crecimiento y estequiometría

La productividad de la biomasa medida (mBP) expresada en g PS m⁻² d⁻¹ y la tasa de crecimiento (% día⁻¹) se incrementaron en todas las especies sometidas a UVR (PAB) respecto al control (PAR), aunque solo en *H. incurva* este efecto fue interactivo en T x L ($p < 0.01$) (Figura. 2.3A). En *H. cornea* y *G. longissima*, tanto producción como la tasa de crecimiento, mostraron cambios significativos a lo largo del tiempo ($p < 0.05$). Los valores más altos para estas variables se observaron al cuarto día de experimentación observándose un descenso de estos valores a lo largo del tiempo. En el caso de *H. incurva*, en el tratamiento PAB, hubo pérdida de biomasa al final del experimento y resultó gravemente afectada por la interacción T x L al final del experimento (día 14).

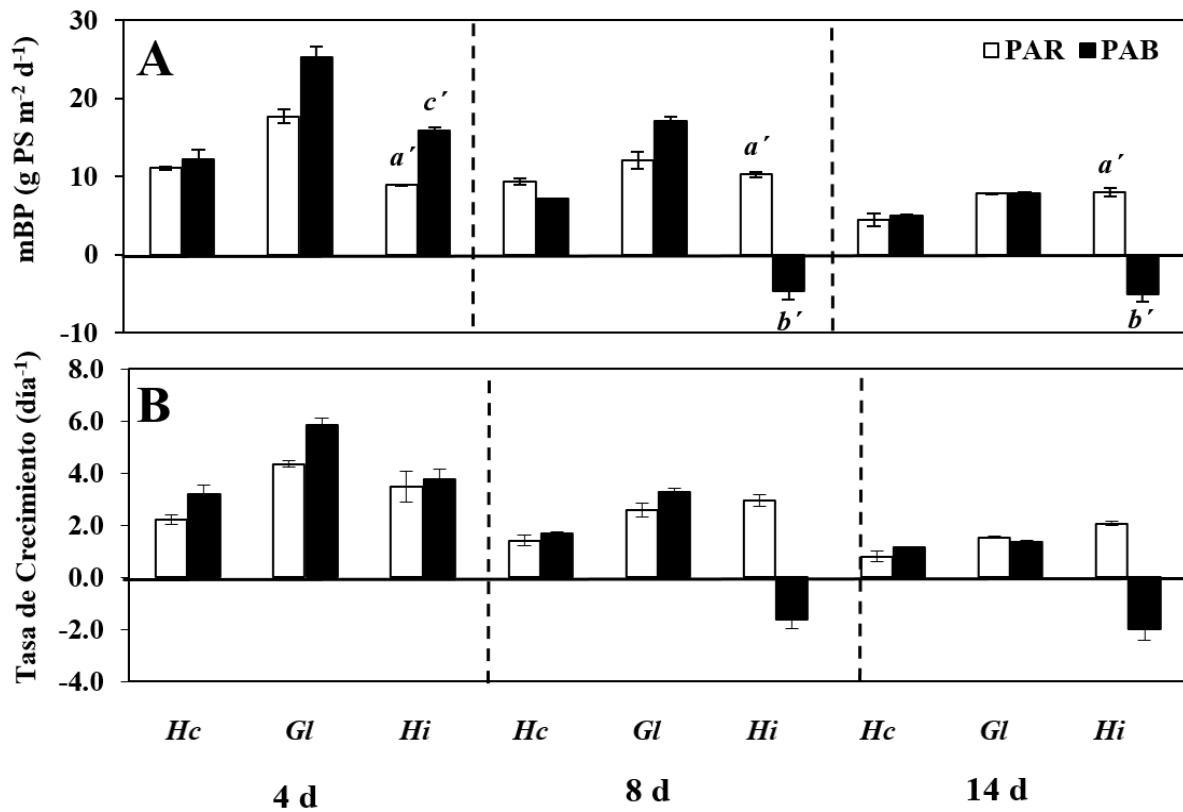


Figura 2.3. Productividad de la biomasa (mBP) en g PS m⁻² d⁻¹ (A) y tasa de crecimiento (% día⁻¹) (B) en *H. cornea* (Hc), *G. longissima* (Gl) y *H. incurva* (Hi) en el momento inicial y después de 4, 8 y 14 d de cultivo bajo los tratamientos PAR y PAB. Diferentes letras (cursivas en *H. incurva*) indican diferencias significativas para la interacción Tiempo x Luz (T x L) en cada especie de forma independiente (Media ± SE; n = 3).

En cuanto al contenido elemental, en *H. incurva* se observaron efectos interactivos en T x L para el contenido en C, en N y en la relación C/N ($p < 0.05$). Para el último día de experimentación, en esta especie, el contenido en N aumentó en un 70% en el tratamiento PAB respecto a los valores iniciales (Figura 2.4). En *H. cornea*, solo se observaron efectos interactivos en T x L para la relación C/N ($p < 0.01$) mostrando un ligero aumento en esta proporción para ambos tratamientos con respecto al tiempo. Por último, en *G. longissima* no se observaron cambios significativos con respecto al tiempo ($p < 0.05$) encontrándose valores más altos de esta proporción al octavo día de experimentación.

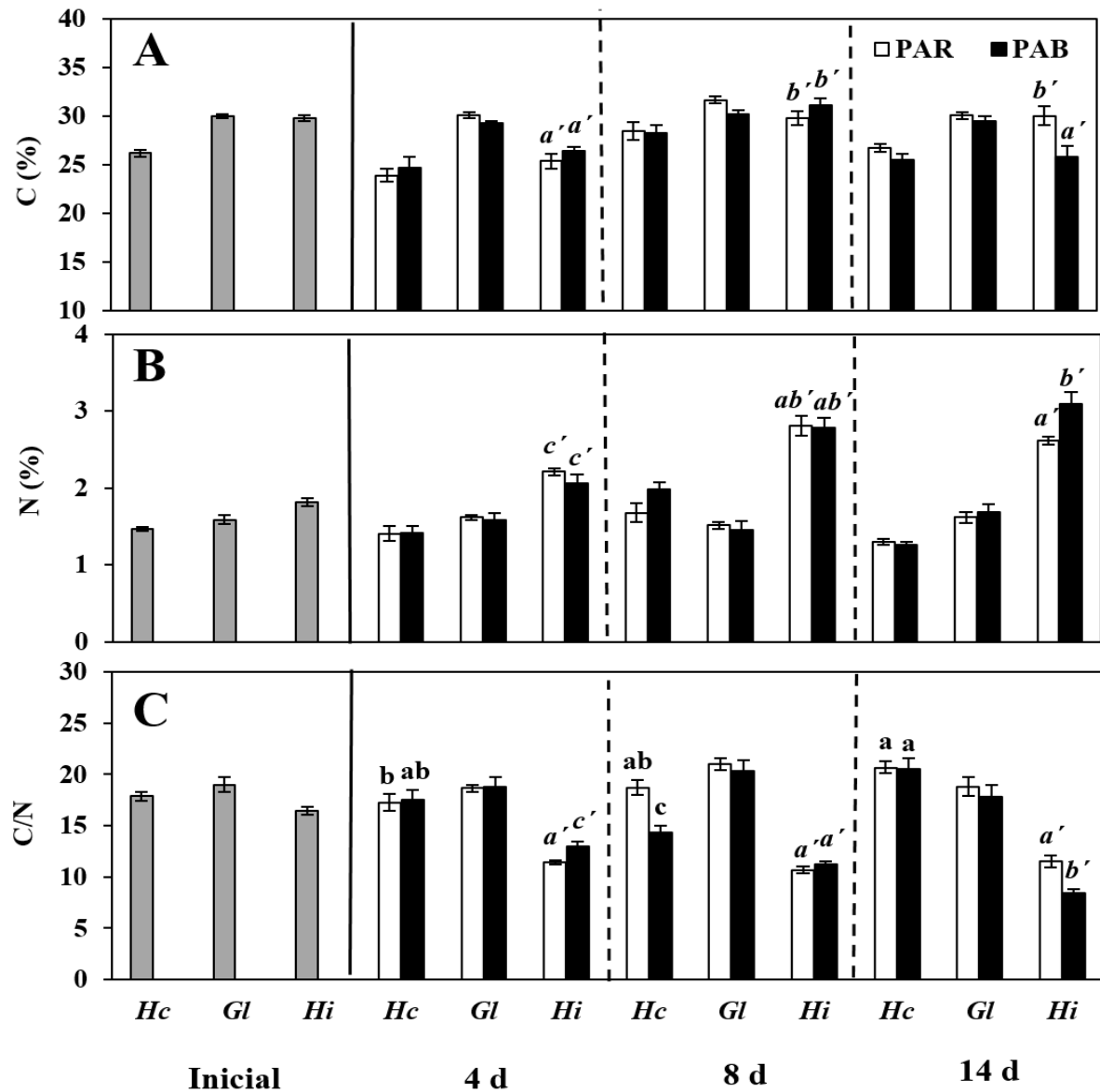


Figura 2.4. Contenido elemental en carbono (A), nitrógeno (B), y la relación C/N (C) expresadas en % respecto al PS para *H. cornea* (Hc), *G. longissima* (Gl) y *H. incurva* (Hi) en el momento inicial y después de 4, 8 y 14 d de cultivo bajo los tratamientos PAR y PAB. Diferentes letras (minúsculas en *H. cornea* y cursivas en *H. incurva*) indican diferencias significativas para la interacción Tiempo x Luz (T x L) en cada especie de forma independiente (Media \pm SE; n = 3).

3.5. Composición bioquímica

La composición porcentual en carbohidratos, mostró un efecto interactivo para T x L en *H. cornea* y en *H. incurva* ($p < 0.01$), mientras que para *G. longissima*, solo se observaron cambios significativos con respecto al tiempo ($p < 0.05$) alcanzándose los valores más bajos al inicio del experimento (inicial) respecto al último día (14 d) (Figura 2.5A). El contenido en lípidos totales solo resultó afectado interactivamente por T x L en *H. cornea* ($p < 0.01$) mientras que en *G. longissima* y *H. incurva* no hubo diferencias significativas para ninguna de las variables independientes (Figura

2.5B). El contenido en proteínas resulto influenciado interactivamente en T x L solo para *G. longissima* ($p < 0.01$), no existiendo diferencias significativas en *H. cornea* y *H. incurva*, manteniendo estas especies valores próximos a los iniciales en ambos tratamientos con respecto al tiempo (Figura 2.5C).

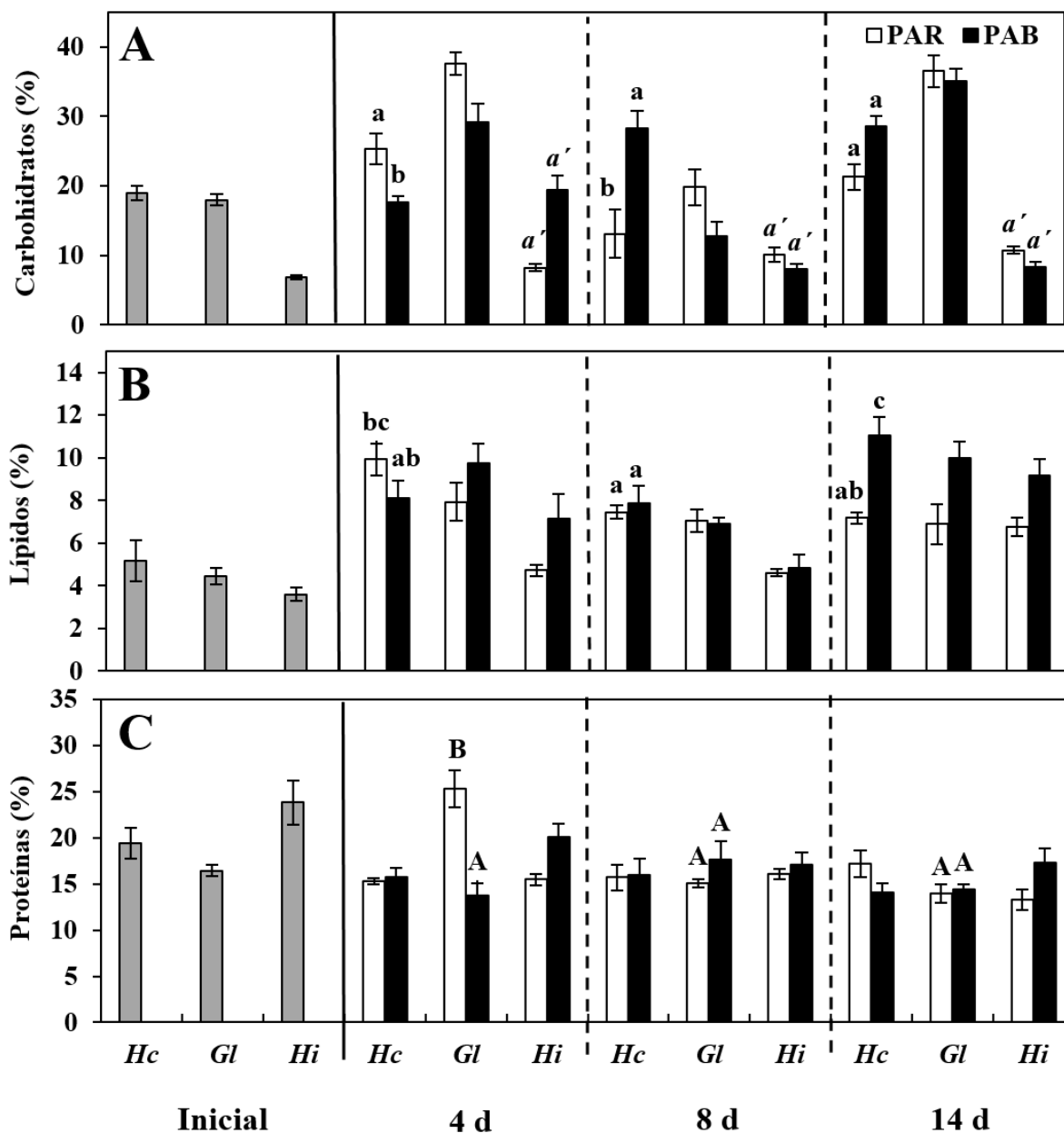


Figura 2.5. Composición en carbohidratos (A), lípidos (B) y proteínas (C) expresadas % respecto al PS para *H. cornea* (Hc), *G. longissima* (Gl) y *H. incurva* (Hi) en el momento inicial y después de 4, 8 y 14 d de cultivo bajo los tratamientos PAR y PAB. Diferentes letras (minúsculas en *H. cornea*, mayúsculas en *G. longissima* y cursivas en *H. incurva*) indican diferencias significativas para la interacción Tiempo x Luz (T x L) en cada especie de forma independiente (Media \pm SE; $n = 3$).

3.6. Fotoprotectores (MAAs y compuestos fenólicos) y Actividad antioxidante

El contenido en MAAs totales, compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante ABTS, mostró diferencias significativas para el efecto interactivo T x L en todas las especies estudiadas ($p < 0.05$), excepto en la composición fenólica para *G. longissima* la cual no cambió a lo largo del experimento (Figura 6A, B y C). El aumento de la actividad antioxidante se correlacionó, en *H. cornea*, con la relación C/N ($r = 0.68$; $p < 0.01$) contenido fenólico ($r = 0.96$; $p < 0.01$), contenido de carbohidratos totales ($r = 0.64$; $p < 0.01$), proteínas ($r = 0.85$; $p < 0.00$) y los MAAs Palythine ($r = 0.87$; $p < 0.00$), Palythanol ($r = 0.84$; $p < 0.00$) y con los MAAs totales ($r = 0.61$; $p < 0.03$). En *G. longissima*, el contenido antioxidante también se correlacionó con el contenido fenólico ($r = 0.73$; $p < 0.00$), con el MAA Palythine ($r = 0.51$; $p < 0.04$), Asterina-330 ($r = 0.71$; $p < 0.00$), Palythanol ($r = 0.69$; $p < 0.00$) y MAAs totales ($r = 0.50$; $p < 0.04$). En *G. longissima*, también se observó una correlación negativa entre la capacidad antioxidante y la producción ETR_{max} ($r = -0.52$; $p < 0.04$), el contenido de FC ($r = -0.84$; $p < 0.00$) y el contenido de FE ($r = -0.58$; $p < 0.01$). En *H. incurva*, también se observó una correlación negativa entre la capacidad antioxidante y las ficobiliproteínas: FC ($r = -0.97$; $p < 0.03$) y FE ($r = -0.99$; $p < 0.00$). Por otro lado, se observó correlación positiva entre la capacidad antioxidante y el contenido fenólico ($r = 0.95$; $p < 0.05$) y proteico ($r = 0.99$; $p < 0.00$).

Mediante espectrometría de masas (ESI-MS), se determinó un compuesto bromofenólico (3-bromo-4,5-dihidroxifeniletanol sulfato: $C_8H_9BrO_6S$), tanto en *G. longissima* como en *H. incurva*, con una masa atómica observada de 334.91954 (en ambas especies) y una masa atómica calculada de 334.91959 (ppm 0.1) y 334.96646 (ppm 0.06) para *G. longissima* y *H. incurva* respectivamente (Material suplementario, Figura S.2.1).

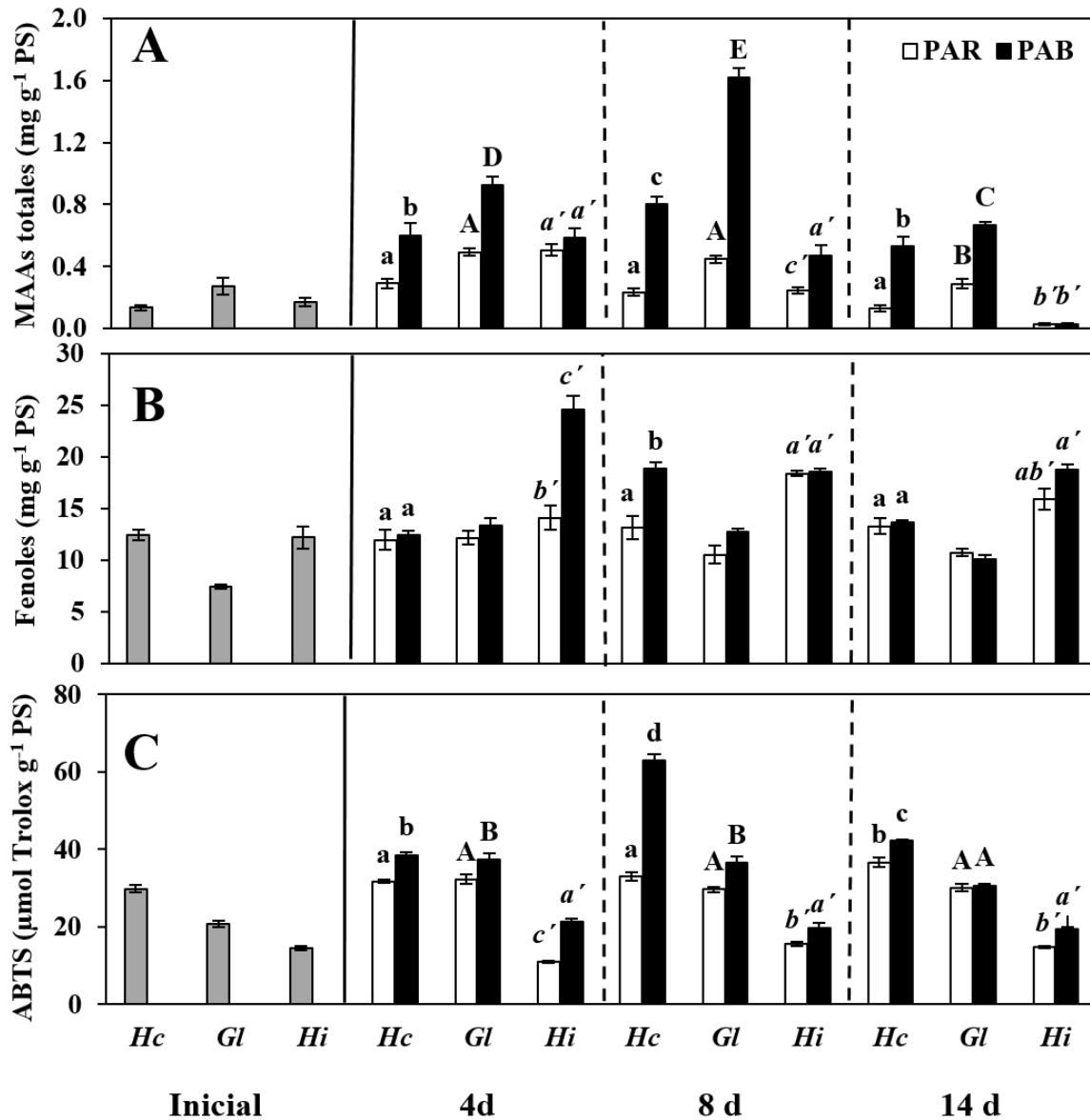


Figura 2.6. Contenido en MAAs totales (mg g⁻¹ PS) (A), fenoles (mg g⁻¹ PS) (B) y capacidad antioxidante (μmol TEAC g⁻¹ PS) (C) en *H. cornea* (Hc), *G. longissima* (Gl) e *H. incurva* (Hi) en el momento inicial y después de 4, 8 y 14 d de cultivo bajo los tratamientos PAR y PAB. Diferentes letras (minúsculas en *H. cornea*, mayúsculas en *G. longissima* y cursivas en *H. incurva*) indican diferencias significativas para la interacción Tiempo x Luz (T x L) en cada especie de forma independiente (Promedio ± S.E.; n = 3).

En cuanto a los cinco MAAs encontrados en las 3 especies (Palythine, Asterina-330, Palythanol, Shinorine y Porphyr-334), las proporciones porcentuales en cuanto al total de MAAs en mg g⁻¹ PS, se vieron afectados por el tiempo (T) y el tratamiento lumínico (L) (Figura 7). El MAA Palythine, en *H. cornea* se incrementó significativamente con respecto al inicial y al control (PAR) mientras que para *G. longissima* y *H. incurva* este aminoácido disminuyó viéndose afectado significativamente en las tres especies por el efecto interactivo (T x L) $p < 0.05$. El contenido de

Asterina-330 y de Palythanol, aumentó en las tres especies con respecto a los tratamientos PAR, sin embargo, para las tres especies estudiadas, los aminoácidos Shinorine y Porphyra-334 decayeron en el tratamiento PAB con respecto al tratamiento PAR.

En *H. incurva*, el aminoácido mayoritario fue Asterina-330 (90% aprox. respecto al total) durante todo el experimento, pero finalmente, el día 14, Shinorine sustituyó a este (Figura. 7). En *G. longissima*, al final del experimento también se incrementó el contenido de Shinorine (80-85%). Por último, en *H. cornea*, el aminoácido Palythanol no se encontró para el último día de experimento (día 14), teniendo en cuenta que este suponía el 37% de contenido total de MAAs al inicio del experimento.

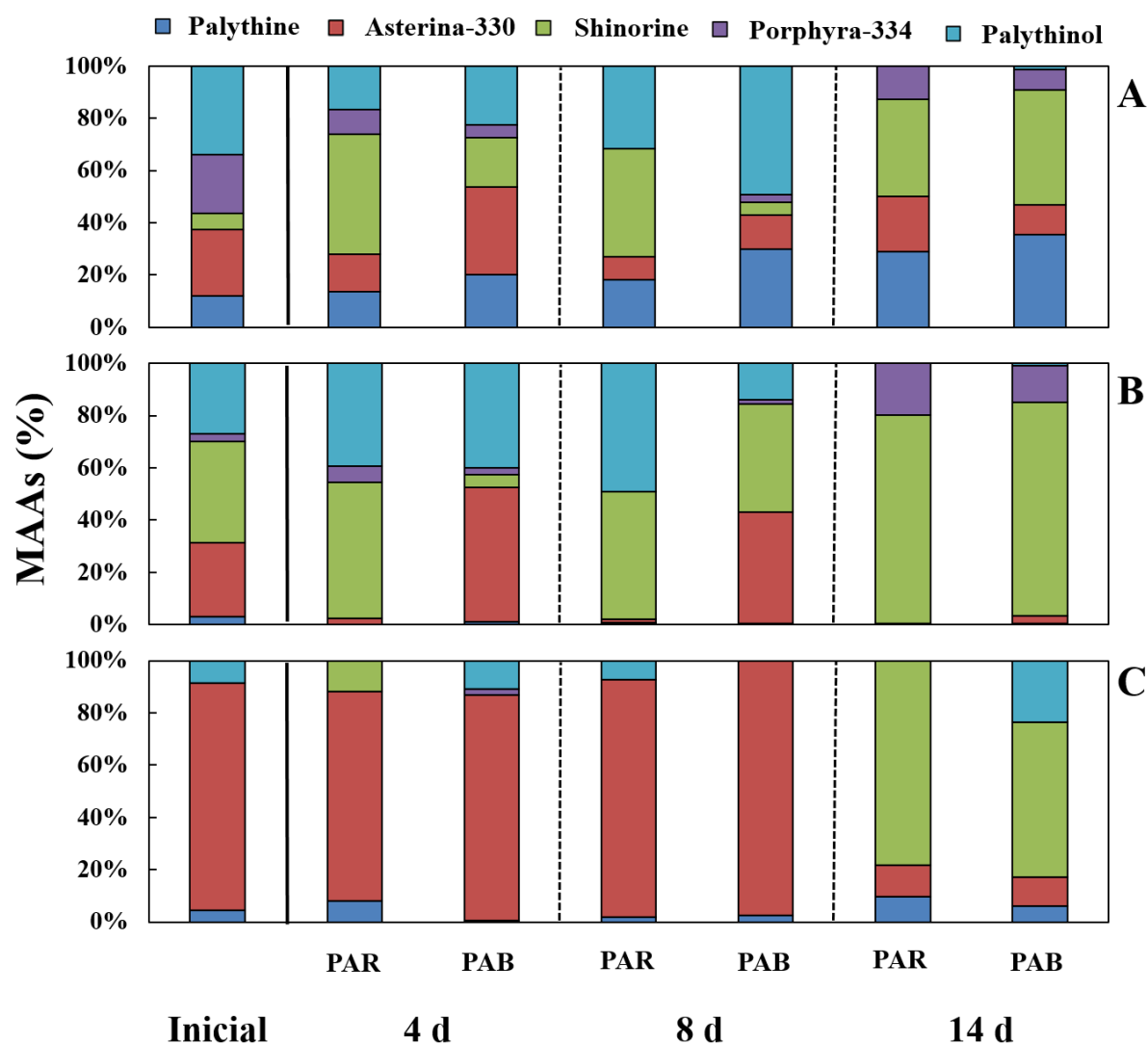


Figura 2.7. Distribución de los distintos tipos de MAAs en % (Palythine, Asterina-330, Shinorine, Porphyra-334 y Palythanol) con respecto al total de MAAs (mg g^{-1} PS) en *H. cornea* (A), *G. longissima* (B) y *H. incurva* (C) en el momento inicial y después de 4, 8 y 14 días de cultivo bajo los tratamientos PAR y PAB. (Promedio \pm S.E.; $n = 3$).

4. Discusión

Se estudió el efecto de la UVR en tres especies de algas rojas (*Hydropuntia cornea*, *Gracilariopsis longissima* y *Halopithys incurva*) observándose que bajo esta radiación, se mantenían altas tasas fotosintéticas, altos contenidos en compuestos de interés y una productividad de biomasa y crecimiento (a excepción de *H incurva* en cuanto a la productividad de biomasa). Las algas sometidas a PAB (PAR + UVA + UVB) con alto N ($150 \mu\text{M NH}_4^+$ y $15 \mu\text{M PO}_4^{3-}$; N/P=10) presentan diferentes patrones fisiológicos y metabólicos respecto con sólo radiación PAR. Estos cambios fueron detectados por medidas de las variables fisiológicas y bioquímicas mediante el uso de indicadores funcionales de acuerdo a Figueroa & Korbee (2010), siendo la especie *H. incurva* la especie más afectada negativamente por la UVR en cuanto a la productividad de biomasa y al crecimiento. La radiación UVR induce genes que codifican las proteínas implicadas en la biosíntesis de pigmentos fotoprotectores, en la reparación del ADN, en la estimulación de sistemas antioxidantes enzimáticos. También UVR induce genes que regulan la fotosíntesis, genes del ciclo celular y genes relacionados con el estrés metabólico (Portwich & Garcia-Pichel 2000; Kräbs et al. 2002, 2004; Brosché & Strid 2003). Por ende, la UVR, a estas dosis estudiadas y en estas especies, actuaría como un mecanismo inductor para la biosíntesis de compuestos fotoprotectores y antioxidantes permitiendo estas especies, alcanzar un equilibrio homeostático frente al estrés generado por exposición a UVR (Rastogi et al. 2017).

La relación experimental de UVA/UVB (20.4) en el tratamiento PAB, fue próxima a la natural (Leckner 1978; Holzinger & Lütz 2006; Häder et al. 2007). Se sabe que el exceso de PAR también puede producir fotoinhibición (Bischof et al. 2006), y que altos niveles de PAR están relacionados con altos niveles de UVR. Sin embargo, en este estudio se incrementó la relación UVR/PAR (0.43) con respecto a las condiciones naturales para poder determinar como la UVR induce a la síntesis de compuestos derivados del metabolismo primario y secundario (Holzinger & Lütz 2006), por lo que no se han tenido en cuenta los posibles efectos interactivos existentes entre la radiación PAR y la UVR.

4.1. Morfología

En las tres especies de algas rojas estudiadas, la morfología, el color, las ramificaciones y el grosor se vieron alterados. Estas características morfológicas alteradas por exposición a UVR, determinan fuertemente la capacidad y la producción fotosintética a partir de la luz (Agustí et al. 1994; Enríquez et al. 1994). Las diversas capas celulares, caracterizadas por diferentes propiedades ópticas, provocan el auto-sombreado y la dispersión de la luz, lo que da lugar a una absorción luminosa diferencial (Enríquez et al. 1995; Raven & Kübler 2002). En definitiva, las algas pueden adaptarse a condiciones diferentes de radiación modificando sus características morfológicas; por ejemplo, *Ulva rotundata* forma esteras flotantes extendidas, donde las plantas están directamente expuestas a una

radiación solar plena que contrasta con la situación de los individuos que crecen en lugares con menor radiación (Bischof et al. 2002). Aun así, existen estudios donde se examinan las respuestas fisiológicas (fotosíntesis, contenido pigmentario, crecimiento, etc.) de varios grupos de macroalgas expuestas a la UVR donde no se encuentran patrones relacionados con la morfología (Aguilera et al. 1999; Gómez & Huovinen 2011). En cambio, otros factores como la posición a lo largo de la costa, determinan fuertemente el rendimiento fisiológico de las algas como se ha reportado para los ecotipos de sol y sombra de los géneros de algas rojas *Porphyra* (Figueroa et al. 1997; Figueroa et al. 2003) y *Gelidium* (Gómez & Figueroa 1998).

4.2. Pigmentos

Con respecto al contenido en Chla y carotenoides totales, estudios previos con macroalgas expuestas a UVR, mostraron una reducción pigmentaria significativa tras exposición a esta radiación (Figueroa et al. 1997; Aguilera et al. 1999; Figueroa et al. 2003; Roleda et al. 2004, 2012). En un ciclo diario bajo radiación solar en el alga roja *Rissoella verruculosa*, el contenido de pigmentos presentó variaciones horarias en cuanto al contenido de FE, pero no de Chla y de FC, que disminuyó en PAB respecto sólo PAR (Flores-Moya et al. 1998). También, en *Porphyra leucostica*, se observó este patrón cuando se comparan entre los mismos tratamientos lumínicos para las mismas intensidades lumínicas (Figueroa et al. 1997). La exposición a UVB (8 W m^{-2}) durante 6 h, en la cianobacteria marina *Phormidium tenue* causó una disminución de los niveles de pigmentos fotosintéticos Chla, y carotenoides en un 74% y un 83.5% respectivamente (Bhandari & Sharma 2011). En la cianobacteria *Aulosira fertilissima*, los pigmentos fotosintéticos fueron completamente degradados después de 2-3 h de irradiación con UVB (5 W m^{-2}), lo que sugiere la pérdida de transferencia de energía efectiva de los pigmentos accesorios al PSII (Banerjee & Häder 1996). En *Nostoc muscorum*, después de 70 min de exposición a UVB (3.5 W m^{-2}), la FC, los carotenoides y la Chla se redujeron 86%, 81.3% y 76.9%, respectivamente, mientras que en las especies de este estudio, cultivadas a 0.6 W m^{-2} (UVB) en un fotoperiodo de 16:8 (lo que hace mayor dosis acumulativa además del efecto irradiancia) no produjo efectos tan drásticos a nivel pigmentario como en estos estudios citados (Agrawal & Chaudhary 1996) por el simple hecho de que las fuentes de radiación son diferentes y predominan longitudes más cortas en la UVB de los estudios citados. En definitiva, la UVR, en estas especies estudiadas, tiene consecuencias negativas sobre los pigmentos fotosintéticos, ya sea por degradación o por inhibición de enzimas implicadas en su ruta biosintética (Ranjbarfordoei et al. 2011).

La coloración de los talos está íntimamente relacionada con el contenido pigmentario. Tras 14 días de cultivo se aprecian colores menos rojizos y más pardos especialmente en *H. cornea* y *G. longissima* consecuencia de la alteración de la proporción FC/FE. Este agotamiento de N provocado por los mecanismos de reparación dependientes de este nutriente, aumenta las respuestas fotoinhibitorias en la fotosíntesis (Korbee et al. 2004; Barufi et al. 2011), por lo que los pigmentos

fotosintéticos se encuentran íntimamente relacionados con la disponibilidad de N (Davison et al. 2007). Sólo en *H. incurva* se observó un incremento del contenido en ficobiliproteínas bajo PAB, aunque no fue significativo estadísticamente, tal como se ha estudiado con anterioridad en diversas especies de cianobacterias como *Nostoc muscorum*, *Phormidium foveolarum* y *Arthrospira platensis* (Kumar et al. 2016) y en fanerógamas (*Gnaphalium luteo-album*) (Cuadra et al. 1997). En *G. longissima*, los niveles de FC se vieron reducidos bajo tratamiento PAB para los días 4 y 8, tal como se ha observado por otros autores en *Gracilaria tenuistipitata* (Barufi et al. 2012), para luego incrementarse al final del experimento (14 d). Probablemente, estas dos especies al ser sometidas a UVR, presentan un mayor requerimiento de N relacionado con la minimización de los daños inducidos por UVR, ya que, varios mecanismos de reparación frente a UVR, implican enzimas y/o cofactores que poseen N en su composición. Dichos mecanismos estarían siendo demandados preferentemente (Roy 2000). Además, también los mecanismos de reparación de los daños inducidos por UVR para los componentes del transporte electrónico, producen un aumento en la demanda enzimática, dando lugar a mayores necesidades de N. Se ha descrito que las ficobiliproteínas son un mecanismo de almacenamiento de N cuando este se encuentra en condiciones no limitantes en el medio, y que son fuente de N cuando este está en condiciones limitantes (Lapointe & Duke 1984). Se ha estudiado que las ficobiliproteínas del género *Gracilaria* pueden utilizarse como fuente de N, antes de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa / oxigenasa, cuando se someten a condiciones de agotamiento de nutrientes (García-Sánchez et al. 1993; Talarico & Maranzana 2000; Barufi et al. 2012).

4.3. Fotosíntesis

En este estudio, ninguna especie sufrió cambios significativos para el rendimiento cuántico máximo (F_v/F_m) en cuanto al tiempo y al tratamiento lumínico, por lo que no se observó cambios en la irradiancia óptima (I_m). Se ha demostrado que las algas intermareales presentan altas caídas de F_v/F_m al mediodía y un aumento por la tarde mostrando así una fotoinhibición dinámica la cual mejora la recuperación fotosintética (Figueroa & Viñegla 2001; Häder et al. 2002). El patrón de disminución de F_v/F_m en las especies de macroalgas en el medio natural, se ha relacionado con su distribución en profundidad y, en consecuencia, con la capacidad de aclimatación a la radiación fluctuante (Hanelt et al. 2006).

Por otra parte, el presente estudio demostró que la UVR aumenta la producción fotosintética en términos de ETR_{max} en *H. cornea*, *G. longissima* y *H. incurva* con respecto a los valores iniciales, lo que podría estar asociado con la energización que aporta esta radiación para la fijación fotosintética de CO_2 (Gao et al. 2007). Aunque altos niveles de UVR para el día 14 de experimento (final) causaron cambios en la irradiancia óptima (I_m) en las tres especies tal como se observó en otros estudios para macroalgas (Häder et al. 2001), se ha encontrado que dosis moderadas de UVA aumentan el crecimiento tanto de algas rojas, como de verdes y pardas (Xu & Gao 2016) así como la fijación

fotosintética de CO₂ por parte del fitoplancton (Helbling 2003; Gao et al. 2007). La presencia de radiación UVB es este estudio, y en dosis moderadas, produce un efecto positivo sobre la fotosíntesis de las especies estudiadas, tal como se ha visto en macroalgas del mediterráneo las cuales crecen en ambientes con altas dosis de UVR (Flores-Moya et al. 1999) o como las macroalgas de zonas tropicales (Hanelt & Roleda 2009)

También se ha encontrado que la radiación UVA (en dosis moderadas) ayudaría en la reparación del ADN (Pakker et al. 2000a; 2000b). Por otro lado, es probable que para las especies estudiadas, la absorción de energía procedente del intervalo espectral de UVA sea transferida a la Chla, para posteriormente ser emitida como fluorescencia, tal como se observó en *Pseudo-nitzschia multiseries* (Orellana et al. 2004). Además, se ha demostrado que la exclusión de UVB produce una reducción de la actividad fotosintética en macroalgas y una mayor fotoinhibición por altas dosis de PAR (Hanelt & Roleda 2009) y que además, conduce también a una menor recuperación de la fotosíntesis (Flores-Moya et al. 1999). Los valores más altos de producción fotosintética ETR_{max} (superiores a 10.5 $\mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), se observaron en *H. incurva* al final del experimento en PAB, aunque estos valores no concuerdan con los valores de productividad de biomasa obtenidos ($\text{g PS m}^{-2} \text{d}^{-1}$) donde no hubo crecimiento real en términos de peso seco. En esta especie, esto puede ser interpretado debido a que la energía movilizada por la fotosíntesis, no es convertida en crecimiento si no que va dirigida hacia los mecanismos de fotoprotección. En *H. cornea* y *G. longissima*, la producción ETR_{max} aumentó en todos los tratamientos en un 80 y 78.3% (respectivamente) con respecto a los valores iniciales, lo que indicaría que estas especies tolerarían estas dosis de UVR sin afectar a los valores de producción fotosintética.

También, *G. longissima* podría estar invirtiendo gran parte de la energía fotosintética en mecanismos fotoprotectores, es decir, aumento de Ek_{ETR} y disminución de α_{ETR} . También, *G. longissima* presenta mayor NPQ_{max} bajo PAB, indicando así un mayor rendimiento de fotoprotección. Sin embargo, esta estrategia no pudo mantenerse en PAB, provocando una drástica disminución de la capacidad fotosintética, aunque el contenido de Chla y N total interno no se vieran afectados. La reducción de la eficiencia fotosintética como α_{ETR} , puede ser causada por una mayor disipación de calor de acuerdo a Krause & Weis (1991) debido a la agregación del complejo de recolección de luz (LHC) (Ruban & Horton 1995) o a un aumento en la relación de PSII inactivo/activo (Öquist et al. 1992).

Valores altos en el amortiguamiento no fotoquímico (NPQ_{max}) han sido estudiados previamente en especies del género *Ulva* a corto plazo, en incrementos tanto de PAR como de UVR (Figueroa et al. 2003). Sin embargo, a pesar del efecto drástico del aumento de la UVR, también se ha observado aclimatación en esta especie (Grobe & Murphy 1998; Altamirano et al. 2000). Las diferencias explicadas anteriormente para las especies de este estudio pueden ser igualmente demostradas por la

relación ETR_{max}/NPQ_{max} donde *H. incurva* presentó valores más altos y menor disminución que *H. cornea* y *G. longissima*. Las variaciones de ETR_{max}/NPQ_{max} con los cambios de UVR sugieren a este parámetro como un buen indicador de su efecto sobre las respuestas fotosintéticas, es decir, la relación entre la capacidad fotosintética (o productividad) y la disipación de energía (Figueroa et al. 2014)

4.4. Productividad de la biomasa, crecimiento y relaciones estequiométricas C/N

La productividad de la biomasa y el crecimiento, como procesos integradores, siguen siendo los mejores parámetros para explicar el desempeño ecofisiológico en los organismos fotosintéticos (Roleda et al. 2004). Con el aumento de UVR, los mecanismos de fotoprotección pueden resultar insuficientes y pueden producirse cambios y desequilibrios celulares en especies que no toleren altas dosis de UVR (Bowler et al. 1992). Estos desequilibrios conducen a cambios conformacionales en el material genético y, en consecuencia en la replicación, transcripción y traducción genética (Lao & Glazer 1996; Buma et al. 2003), que finalmente conllevaría a una disminución de la biomasa (Franklin & Forster 1997) y de las tasas de crecimiento de macroalgas (Wood 1987). En este estudio, esta reducción en el crecimiento solo se ha observado en *H. incurva* pudiendo estar relacionado con el retraso en el proceso de la división celular, como resultado de la formación de dímeros de pirimidina. Esto, a su vez, provoca una disminución de los recursos genéticos cuando los organismos están expuestos a radiación UVB durante periodos de tiempo más prolongados (Buma et al. 1995; Van De Poll et al. 2001). También, la exposición a UVR reduce la acumulación de productos fotosintéticos, que son ahora movilizados hacia la reparación de los daños celulares y, en consecuencia, limitan el crecimiento y la reproducción. En este sentido, el crecimiento como un proceso celular integrador, sería más adecuado que la fotosíntesis para el estudio del efecto a largo plazo de la exposición a UVR en estas especies. Cabe mencionar que algunas especies son más susceptibles a UVR en cuanto a su capacidad de crecimiento y productividad de biomasa, por ejemplo, en el alga parda *Laminaria ochroleuca* se observó un descenso del crecimiento del 48% en presencia de UVR. Por lo tanto, en líneas generales, los efectos nocivos sobre la producción y el crecimiento aumentaron al aumentar la dosis de exposición (Altamirano et al. 2003).

Otro indicador del estado fisiológico en algas es la estequiometría elemental (índice C/N), ya que este parámetro indica el potencial metabólico para sintetizar biomoléculas a partir del metabolismo secundario (Weykam et al. 1996; Altamirano et al. 2000). La relación C/N es un buen indicador del estado nutricional en los organismos fotosintéticos. Se ha observado que bajo condiciones limitantes de nutrientes, especialmente de N, el crecimiento se ve restringido en los organismos fotosintéticos generando a su vez un aumento en la relación C/N, la cual redundaría en un aumento de la producción de metabolitos secundarios (Duarte 1992; Bryant et al. 2012; Álvarez-Gómez et al. 2016). Sorprendentemente, en el tratamiento PAB, la relación C/N se redujo en las especies estudiadas. En estas especies, la UVR aumentó la acumulación de N y el potencial de crecimiento, mientras que el

bajo nivel de UVB redujo este fenómeno. Varios autores también han propuesto que la acumulación de N sirve para la síntesis adicional de compuestos, como los fotoprotectores para la UVR (Korbee et al. 2005; Huovinen et al. 2006; Figueroa et al. 2009).

4.5. Composición bioquímica

La UVR puede alterar la proporción y la cantidad de las grandes macromoléculas como proteínas, lípidos y carbohidratos (Arts & Rai 1997). Esto se debe a la generación de radicales libres (ROS y NOS) que pueden producir peroxidación lipídica, daño a las proteínas y alteraciones de polisacáridos (Fridovich 1986, Asada 1996).

4.5.1. Carbohidratos

La UVR también causa una disminución en la biosíntesis de carbohidratos en macroalgas, sin embargo en este estudio se produjo un aumento en *H. cornea* y *H. incurva* con respecto a los valores iniciales tanto en los tratamientos PAR como en PAB. Aunque solo en *H. cornea* y a partir del día 8, se observó una mayor cantidad de carbohidratos en el tratamiento PAB que en PAR (+ 53%). Otros autores, investigaron los efectos de la UVR en *Gracilaria edulis* expuesta durante 72 h a UVB y observaron una disminución en el rendimiento de agar, pasando de un porcentaje del 58.8% al 12.5% en 72 h (Eswaran et al. 2002). En este mismo estudio, también se observaron pérdidas en la fuerza del agar por acción de UVR pasando de 125.5 a 47 g cm⁻² en 72 h. La reducción en PAB respecto a PAR, es originada por el fotodaño inducido en *G. longissima* y *H. incurva* y estaría vinculada a una disminución de la expresión génica asociada con la fotosíntesis, la fotorrespiración y el ciclo de Calvin-Benson (Kusano et al. 2011).

4.5.2. Lípidos

La UVR se ha sugerido como variable inductora para la producción de lípidos algales en sistemas de cultivo a gran escala (Guihéneuf et al. 2010). Los efectos del tratamiento PAB para las especies estudiadas, ejercen una inducción positiva en la producción de lípidos totales, por lo que este tipo de radiación en condiciones y dosis controladas, ejercería un rol inductor para la biosíntesis de lípidos a nivel celular (Sharma et al. 2012). En este estudio, el contenido lipídico se incrementó considerablemente con respecto a las condiciones iniciales. Los efectos de la radiación UVR sobre el contenido total de lípidos, ha sido estudiado en profundidad para especies de microalgas con interés para la producción de lípidos transesterificables, faltando más evidencia científica en macroalgas. En un estudio donde se evaluó el contenido lipídico de tres especies de fitoplancton marino antártico *Odontella weissflogii*, *Chaetoceros simplex* y *Phaeocystis antarctica* expuestas a UVA constante y a baja o alta radiación UVB, se observó que el contenido de esteroides, ácidos grasos y lípidos totales de *O. weissflogii* cambió ligeramente bajo UVB en comparación con las condiciones de control. Por el

contrario, cuando *P. antarctica* fue expuesto a baja irradiancia de UVB, los lípidos de almacenamiento se redujeron mientras que los lípidos estructurales aumentaron (Skerratt et al. 1998). *P. antarctica* también contenía una mayor proporción de ácidos grasos poliinsaturados bajo exposición a UVB moderada. La exposición de *P. antarctica* a una alta irradiación con UVB, aumentó las concentraciones totales de lípidos, triacilglicerolos (TAG) y ácidos grasos libres (AGL). Este aumento en la concentración de AGL, principalmente ácidos grasos saturados (AGS), sería indicativo de una degradación de los lípidos complejos durante el tratamiento con alto UVB (Skerratt et al. 1998).

Otro estudio reciente mostró que el uso modulado de la radiación UVA durante 7 días podría conducir a un aumento de la producción de ácidos grasos en *Nannochloropsis* sp. (Forján et al. 2011). Sin embargo, existe la preocupación en la comunidad científica de que el uso constante de la luz UVA, no sea viable para el cultivo a escala industrial, mientras que la radiación UVB (más corta) también podría afectar la composición y producción de lípidos de microalgas como resultado de inhibir la absorción de nutrientes y el mecanismo de asimilación de carbono produciendo, además de producir daños irreversible en el material genético (Guihéneuf et al. 2009).

4.5.3. Proteínas

El contenido en proteínas para las especies estudiadas se redujo con respecto a las condiciones iniciales. Sin embargo, en el tratamiento PAB para cada uno de ellas, se observó un ligero aumento en el contenido proteico. Estos efectos observados se deberían, en parte, al impacto directo de la radiación UVB sobre las proteínas de membrana (Xue et al. 2005) y a la demanda celular requerida para el mantenimiento de la homeostasis y el proceso fotosintético. Las proteínas son blancos potenciales de la UVB, en concreto los aminoácidos aromáticos como el triptófano y la tirosina absorben UVB hasta 305 nm y pueden ser foto-oxidados dando lugar a reticulaciones intermoleculares e intramoleculares provocando una posterior ruptura de la cadena polipeptídica, cambios estructurales o inactivación enzimática (Wilson et al. 1995).

4.6. Fotoprotectores y antioxidantes

4.6.1. Aminoácidos tipo micosporina

Las algas poseen mecanismos para atenuar los efectos generados por la UVR y para ello, presentan estrategias ecofisiológicas que actualmente ya han sido ampliamente estudiadas. Estos mecanismos consisten básicamente en la producción de compuestos químicos, por inducción de la UVR, que ayuden a contrarrestar los efectos nocivos de la UVR como son los MAAs y los compuestos fenólicos (Korbee et al. 2004a; Figueroa et al. 2010; Cabello-Pasini et al. 2011). Numerosos estudios, han demostrado que los MAAs previenen que 3 de cada 10 fotones golpeen dianas sensibles a la UVR a nivel citoplasmático. Las células con altas concentraciones de MAA son 25% más resistentes a la

UVR que aquellas con concentraciones bajas o que no presentan MAAs en su composición (García-Pichel et al. 1993). En este estudio, el contenido en MAAs se incrementó considerablemente para todas las especies con respecto a las condiciones iniciales en el tratamiento PAB alcanzando un máximo en todas las especies el día 8 del experimento (+83% en *H. cornea*, +55% en *G. longissima* y 70% en *H. incurva*).

Los MAAs son verdaderos metabolitos secundarios de uso múltiple y debido a la potente absorción que presentan frente a UVR y a sus propiedades antioxidantes, presentan amplias aplicaciones cosmecéuticas y farmacéuticas (De la Coba et al. 2009; Carreto & Carignan 2011; Wada et al. 2013; Suh et al. 2014). Hasta la fecha, se han identificado más de 35 MAAs diferentes en organismos marinos como las cianobacterias, algas y animales vertebrados e invertebrados (Becker et al. 2016). Los MAA son más abundantes en rodófitas en comparación con las especies de clorófitas y feófitas (Korbee et al. 2006; Figueroa et al. 2012)

La capacidad antioxidante se correlacionó positivamente con el contenido en MAAs en las algas de este estudio. Esta capacidad antioxidante incrementada prevendría, además de la capacidad fotoprotectora, de un mecanismo para mitigar el daño oxidativo ocasionado por el aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (NOS) (Carreto & Carignan 2011). Muchos estudios, corroboran el rol antioxidante de los MAAs, tanto a partir de extractos crudos, como a partir de los compuestos aislados y purificados con la finalidad de estudiar las estudiar sus propiedades antirradicalarias para actuar como eficientes sistemas antioxidantes (De La Coba et al. 2009; Kannaujiya et al. 2014; Rastogi & Incharoensakdi 2014).

4.6.2. Compuestos fenólicos

El efecto de la UVR para las especies estudiadas, se encuentra estrechamente relacionado con la biosíntesis de compuestos fenólicos que también actúan antioxidantes y fotoprotectores, al igual que los MAAs. En este estudio, el aumento de la concentración de compuestos fenólicos se correlacionó con el contenido de MAAs. Esto podría explicar la aclimatación efectiva al aumento de la UVR en el tratamiento PAB, tal como ha sido reportado en otros estudios (Rice-Evans et al. 1997; Karsten et al. 2009). El contenido fenólico se correlacionó, además, positivamente con el amortiguamiento no fotoquímico (NPQ_{max}) en *H. cornea*. Por lo tanto, la acumulación de compuestos fenólicos en esta especie podría ser un proceso relacionado con un aumento de actividad metabólica en el ciclo xantofílico (Goss & Jakob 2010). En *C. tamariscifolia*, Abdala-Díaz et al. (2006) observaron una mayor acumulación de compuestos fenólicos en verano con respecto al invierno como consecuencia de las fluctuaciones de la UVR estacional. Por primera vez, se describe en la literatura científica para *G. longissima* y *H. incurva*, un compuesto bromofenólico sulfatado (3-bromo-4,5-dihidroxifeniletanol sulfato: $\text{C}_8\text{H}_9\text{BrO}_6\text{S}$), con una masa atómica observada de 334.91954 (para ambas especies) y una masa

atómica calculada de 334.91959 (ppm 0.1) y 334.96646 (ppm 0.06) para *G. longissima* y *H. incurva* respectivamente. Este bromofenol sulfatado ha sido descrito como sustancia anticancerígena (Liu et al. 2011) en varias líneas celulares humanas de cáncer HCT-8, Bel-7402, BGC-823, A549 y A2780 (Ma et al. 2006).

Los compuestos fenólicos acumulados bajo un alto suministro de N, también puede proteger las algas contra UVR como se ha comentado. Esto explicaría la correlación positiva encontrada entre el aumento de MAAs y compuestos fenólicos en este estudio para *H. cornea* y *G. longissima*. Estas dos especies mostraron un aumento del contenido en Palythine ($r = 0.88$ y 0.76 ; $p < 0.00$) y Palythanol ($r = 0.80$ y 0.76 ; $p < 0.00$) respectivamente que se correlacionó con el aumento en el contenido fenólico. Estos dos aminoácidos son los dos metabolitos descritos con más capacidad antioxidante (Dunlap & Yamamoto 1995, De La Coba et al. 2009; Wada et al. 2015). Solo en *G. longissima* se correlacionó el contenido de Asterina-330 ($r = 0.66$; $p < 0.00$) con los compuestos fenólicos. En *H. incurva*, no se encontró correlación alguna. Estas correlaciones entre compuestos fenólicos y MAAs pueden ser debidas a que, en la ruta biosintética de ambos grupos de compuestos (ruta del ácido shikímico), comparten algún sustrato común. En algas pardas, por ejemplo, se ha demostrado que los compuestos fenólicos se acumulan y fotoprotegen el aparato fotosintético (Cerantola et al. 2006). El incremento estacional de radiación solar produce un incremento del contenido de compuestos fenólicos en otras especies algales (Abdala-Díaz et al. 2006; Celis-Plá et al. 2016). En este estudio, se demuestra que los compuestos fenólicos no son sólo filtros de UVR, sino que también ejercen un rol antioxidante. Además de la radiación solar, la disponibilidad de N influye en la acumulación de compuestos fenólicos. En estudios realizados con algas pardas y verdes, se ha demostrado que el aumento de la concentración de N en el medio produce un aumento en la acumulación de compuestos fenólicos (Pavia & Toth 2000; Cabello-Pasini et al. 2011; Celis-Plá et al. 2015). En consecuencia, la disponibilidad de N podría reducir el efecto negativo de la UVR, ya que los compuestos fenólicos pueden aumentar tanto la fotoprotección, como el barrido de radicales libres dentro de las células (Cerantola et al. 2006).

5. Conclusiones

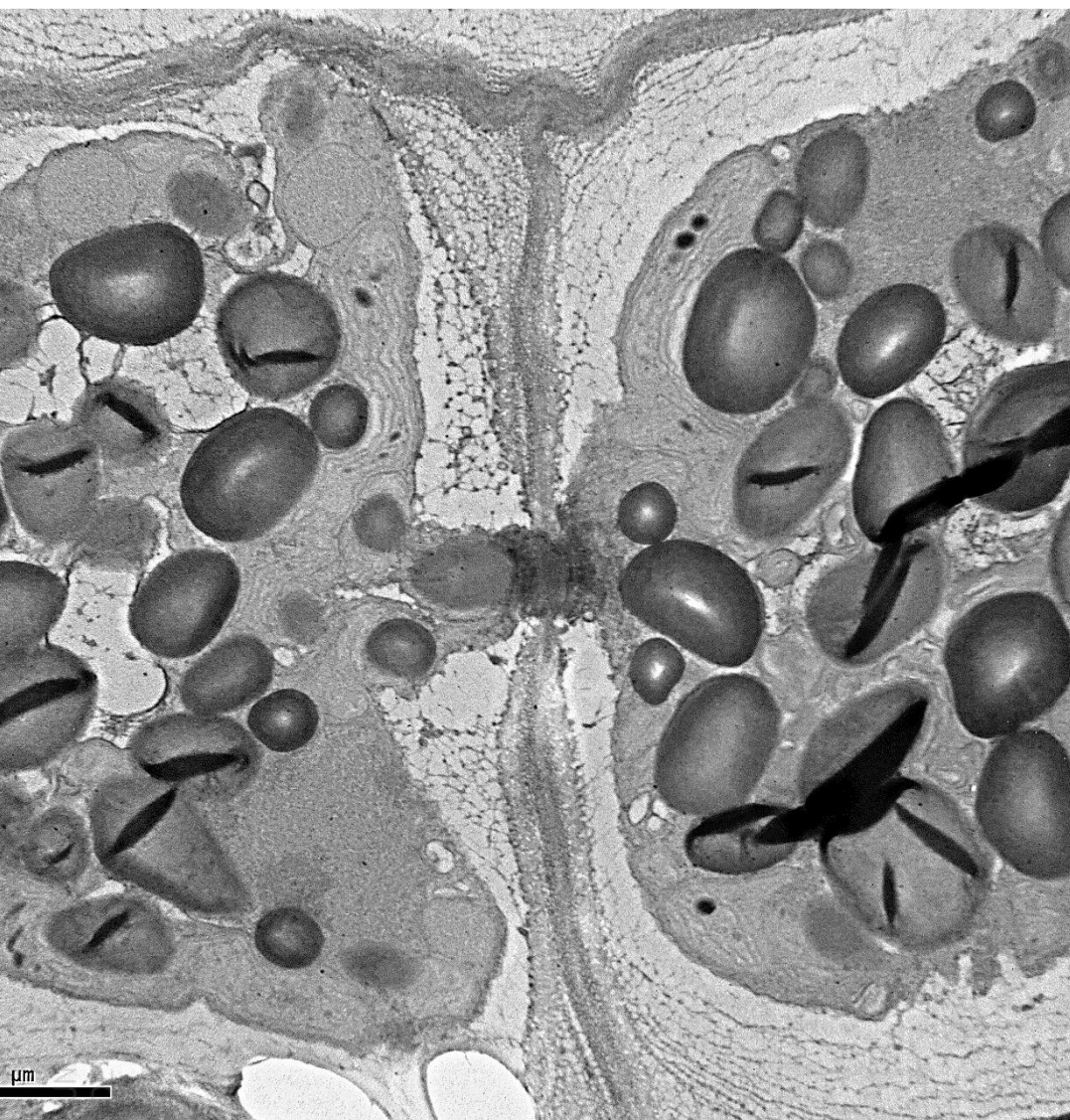
Gracilariopsis longissima, *Hydropuntia cornea* y *Halopithys incurva* presentaron un mecanismo eficaz de fotoprotección basado en la acumulación de compuestos fotoprotectores frente a la UVR, alta disipación de energía y alta capacidad antioxidante, además del crecimiento en condiciones de alto N-NH_4^+ (150 μM). Solo *H. incurva* en el tratamiento PAB, mostró un decaimiento de la biomasa al no conseguir adaptarse a estas condiciones experimentales. Este estudio abre la posibilidad para el cultivo de *H. cornea* y *G. longissima* bajo UVR y altos niveles de N inorgánico (especies ya cultivadas anteriormente a gran escala) lo que permita un uso biotecnológico de la biomasa

basado en el concepto de biorrefinería. Esta biomasa podría ser canalizada con éxito para usos dermatológicos, cosméticos y nutracéuticos, entre otros.



Capítulo 3

Efectos combinados de la radiación UV y los nutrientes sobre
la ultraestructura celular, la fotosíntesis y la composición
bioquímica en *Gracilariopsis longissima* (Gracilariales,
Rhodophyta)





Efectos combinados de la radiación UV y los nutrientes sobre la ultraestructura celular, la fotosíntesis y la composición bioquímica en *Gracilariopsis longissima* (Gracilariales, Rhodophyta)

3

1. Resumen

En el capítulo, se discuten las implicaciones biotecnológicas de los cambios metabólicos relacionados con la disponibilidad de la radiación y los nutrientes en *Gracilariopsis longissima* en un experimento bifactorial en el laboratorio durante 14 días. Además de las variables fisiológicas y bioquímicas, en este estudio, se analizó la morfología y la ultraestructura a nivel celular mediante microscopía óptica (LM del inglés, *Light Microscopy*) y de transmisión (TEM del inglés *Transmission Electron Microscopy*). Se observaron tres alteraciones morfológicas principales relacionada con mecanismos de defensa contra la UVR: un incremento en el espesor de la pared celular, una mayor acumulación de gránulos de almidón y una multiplicación del número de capas de células corticales. El contenido de compuestos nitrogenados (proteínas y MAAs) y compuestos fenólicos aumentó a lo largo del tiempo. Se observó una interacción significativa entre los factores, radiación y nutrientes, en diferentes variables como clorofila *a* (Chl*a*), carotenoides, almidón, lípidos, capacidad antioxidante y viabilidad celular. Por lo tanto, *G. longissima* mostró una alta aclimatación a UVR bajo alta disponibilidad de nutrientes sin mostrar disminución en la tasa fotosintética a la vez que aumentó la acumulación de compuestos nitrogenados con rol fotoprotector y con capacidad antioxidante (MAAs). Sin embargo, el contenido de almidón, lípidos y compuestos fenólicos, aumentaron principalmente en presencia de UV bajo limitación de nutrientes.

2. Material y métodos

Especímenes de *Gracilariopsis longissima* se recolectaron en el río San Pedro (36° 32 ' 52" N 6° 12' 33" W), Cádiz, España, en junio de 2014. Este río tiene una concentración media anual de 1.4 μM PO_4^{3-} , 3.5 μM de NO_3^- y 5.6 μM de NH_4^+ (Hernández et al. 2005). La biomasa algal fue transportada al laboratorio del Departamento de Ecología de la Universidad de Málaga (España), a baja temperatura y en recipientes de plástico. Para eliminar las algas epífitas que pudiesen estar adheridas, la biomasa se limpió con ayuda de un pequeño cepillo y con agua de mar filtrada.

G. longissima se mantuvo en medio Provasoli (Provasoli et al. 1957) modificado por Bold & Wynne (1978) hasta el comienzo de la experimentación (t_a). Siete días antes del comienzo del experimento (tiempo inicial: t_0), las algas se colocaron en agua de mar (sin adición alguna de nutrientes) en un recipiente de metacrilato de polivinilo (Plexiglass vidrio XT - 29080) con un volumen de 1.5 L de agua de mar (12 cilindros). La atenuación en los cilindros tanto de UVB ($\lambda = 280-315$ nm) como de UVA ($\lambda = 315-400$ nm) fue de 34 y 21% respectivamente, mientras que la atenuación de PAR ($\lambda = 400-700$ nm) fue del 17%. Se pueden encontrar más detalles sobre el espectro de transmisión de la radiación en los recipientes experimentales empleados en Aphalo et al. (2012) y en “Material y métodos generales. Ep 1.1.1) de la presente Tesis Doctoral. La radiación PAR se obtuvo a partir de tres lámparas fluorescentes (Phillips TL-D® 36W / 54-765) y la UVR se obtuvo usando dos lámparas Q-Panel® 340 (Q-Panel Co., Ohio, EE.UU). Tanto la cantidad, como la calidad espectral utilizada en estos experimentos así como la transmisión de los cilindros (Material y métodos generales, Figura M.3), se determinó con un espectrorradiómetro multidiodo, Sphere Optics, modelo SMS-500 (Sphere optics LLC, Concord, NH).

El experimento consistió en un diseño factorial (2×2) con dos tratamientos de luz (PAR y PAB) y dos niveles de nutrientes (alto y bajo). Los tratamientos fueron iguales a los del capítulo anterior (**Capítulo 2**) (Material y métodos generales, Tabla M.1). La irradiancia de PAR fue de $141 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, y de UVA 12.7 W m^{-2} y 0.6 W m^{-2} para UVB. El fotoperiodo en ambos tratamientos fue 16: 8 (luz: oscuridad). Con el fin de determinar dosis biológicamente efectivas, expresadas como dosis diaria (KJ m^{-2}), se emplearon espectros de acción para el daño del ADN (Setlow 1974), fotoinhibición de cloroplastos (Jones & Kok 1966), inhibición de la fotosíntesis (Calpsell 1971) y peroxidación de los lípidos (Morliere et al. 1995).

Los dos tratamientos de nutrientes fueron los siguientes: bajo contenido en nutrientes (LN, $\text{NH}_4\text{Cl } 10 \mu\text{M} + 1 \mu\text{M HNa}_2\text{PO}_4$) y alto contenido en nutrientes (HN, $\text{NH}_4\text{Cl } 300 \mu\text{M} + \text{HNa}_2\text{PO}_4 30 \mu\text{M}$), siendo así la proporción N: P igual en ambos tratamientos (10:1). El reemplazo del agua de mar se hizo cada 48 h con el fin de evitar la limitación de nutrientes. La densidad de la biomasa a lo largo del experimento fue de 9 g PF L^{-1} . La temperatura se midió durante todo el experimento utilizando un registrador HOBO U22 Water Temp Pro V2 (Onset Computer Corporation, Massachusetts, EEUU) y se mantuvo en 26 ± 1 °C en todos los tratamientos en una cámara de cultivo. Las algas se airearon continuamente dentro de los cilindros usando una bomba de aire. Se incubaron tres cilindros réplica para cada combinación de tratamientos, por lo tanto, un total de 12 cilindros. La conductividad media del agua de mar durante el experimento fue de $52.1 \pm 6.1 \text{ mS cm}^{-2}$, la salinidad 35.6 g L^{-1} y el pH de 7.9 ± 0.2 .

Los parámetros fotosintéticos y los análisis bioquímicos se determinaron durante el tiempo de aclimatación justo al llegar del medio natural al laboratorio (t_a), al tiempo inicial (t_0 , tras 7 días sin adición de nutrientes, sólo agua de mar) y después de 14 días de cultivo en los cuatro tratamientos. Las muestras para el análisis bioquímico se almacenaron a -80°C para posteriores análisis. Para la determinación y cuantificación de MAAs, las muestras se desecaron en gel de sílice. La metodología empleada en este capítulo (análisis bioquímico, fotosíntesis, microscopía y viabilidad celular), se detalla en el apartado “Material y métodos generales” de esta Tesis Doctoral.

3. Resultados

3.1. Morfología

Las muestras aclimatadas de *G. longissima* mostraron ramificaciones rojizas típicas de las Gracilariales (Figura 3.1A). Después del período experimental, las muestras cultivadas con LN+PAR mostraron nuevas ramificaciones de color verdoso (Figura 3.1B). Por otro lado, los especímenes cultivados con HN+PAR fueron más rojizos y con nuevas ramificaciones (Figura 3.1C). Los tratamientos con LN+PAB (Figura 3.1D) y HN+PAB (Figura 3.1E) mostraron una reducción significativa en el número de ramificaciones con un color verdoso oscuro.

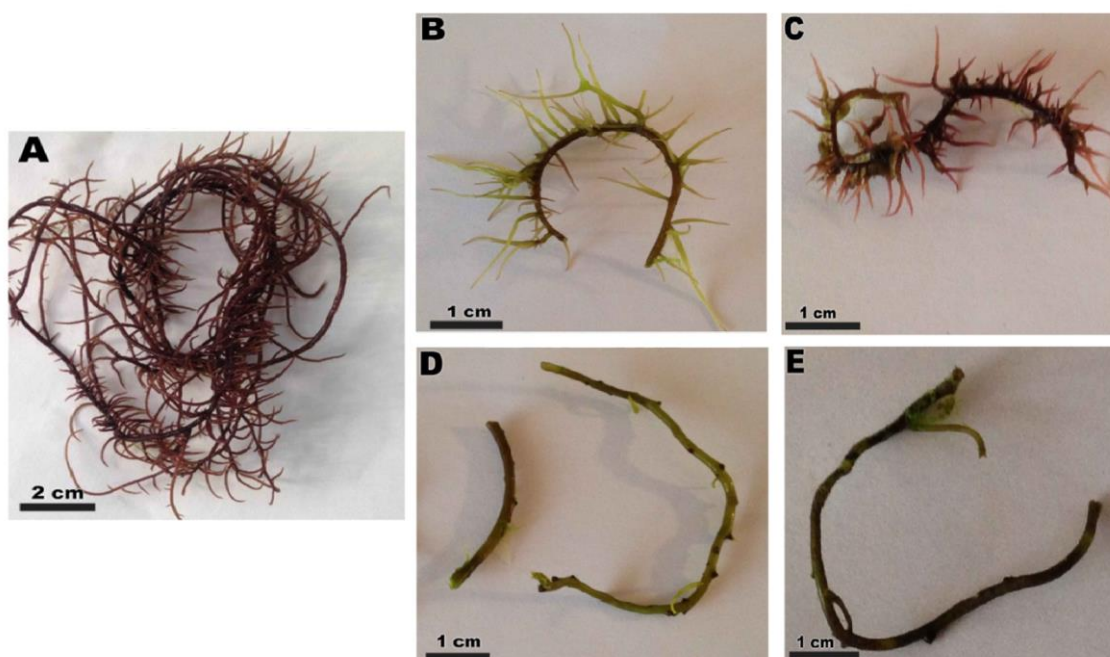


Figura 3.1. Morfología de *G. longissima* antes y después del cultivo con radiación PAR y PAB, y con dos niveles de nutrientes (alto: HN y bajo: LN). Las muestras aclimatadas (A) y tras 14 días de cultivo bajo los distintos tratamientos: LN+PAR (B), HN+PAR (C), LN+PAB (D) y HN+PAB (E).

3.2. Observación bajo Microscopía óptica (LM) y Citoquímica

La región cortical de *G. longissima*, mediante visualización de los cortes transversales, reveló la existencia de dos a tres capas de células (Figura 3.2A). En la capa más externa, las células son alargadas, mientras que en la segunda y tercera capa, las células se vuelven esféricas (Figura 3.2A). Las células subcorticales contienen más vacuolas en comparación con las células corticales (Figura 3.2A).

Las muestras aclimatadas de *G. longissima* teñidas con azul de toluidina mostraron una reacción metacromática en la pared celular (Figura 3.2A), lo que indica la presencia de polisacáridos ácidos, como el agar. Similar a las muestras aclimatadas, en LN+PAR (Figura 3.2B) y en HN+PAR (Figura 3.2C), en las muestras teñidas con TB-O las células presentaron similar metacromasia en la pared celular. Sin embargo, las muestras de *G. longissima* expuestas a la UVR formaron nuevas capas de células corticales y aumentaron el grosor de la pared celular tanto en las células corticales como en las subcorticales (Figuras 3.2D-E).

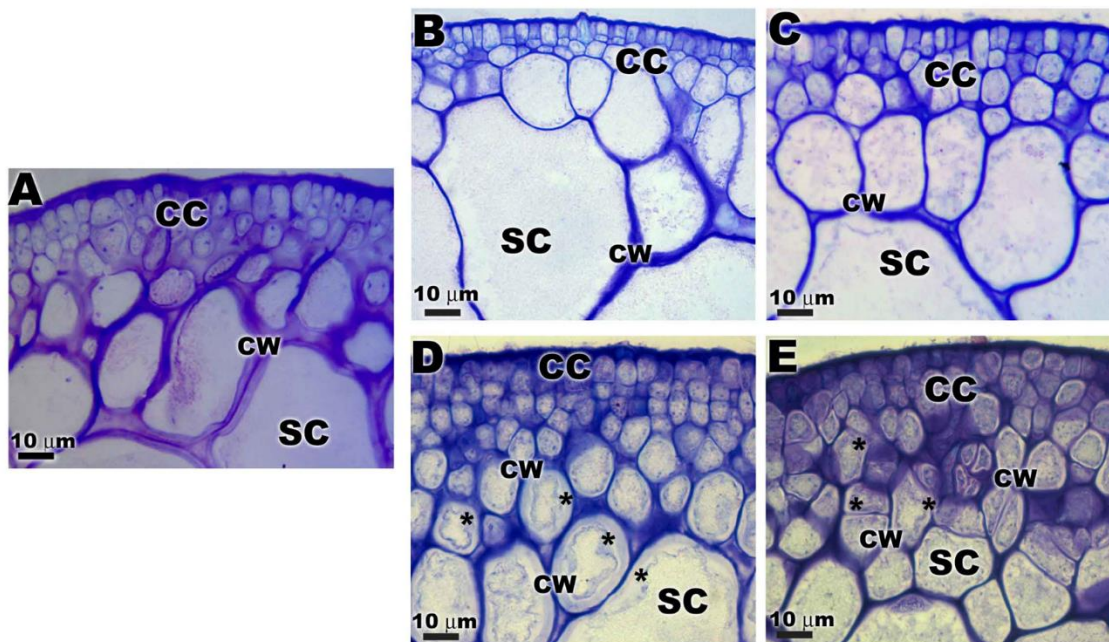


Figura 3.2. Microscopía óptica para los cortes transversales en talos de *G. longissima* y teñidos con TB-O tras 14 días sometidas a los distintos tratamientos. Obsérvese la reacción metacromática en la pared celular (CW) de las células corticales (CC) y subcorticales (SC). Los asteriscos indican un aumento del grosor en la pared celular. Las muestras aclimatadas (A) y tras 14 días de cultivo bajo los distintos tratamientos: LN+PAR (B), HN+PAR (C), LN+PAB (D) y HN+PAB (E).

Las muestras aclimatadas de *G. longissima* teñidas con ácido periódico-Schiff (PAS) presentaron una reacción positiva en la pared celular, indica la presencia de compuestos celulósicos

(Figura 3.3A). En el citoplasma de las células corticales y subcorticales, se observó una reacción positiva relacionada con gran cantidad de gránulos de almidón (Figura 3.3A).

Todas las muestras cultivadas, teñidas con PAS, mostraron una reacción en la pared celular y en los gránulos de almidón similar a la observada en las muestras aclimatadas (Figuras 3.3B-E). Mediante la reacción PAS, también fue posible detectar un aumento en la densidad de los gránulos de almidón en las células corticales y subcorticales expuestas a LN+PAR (Figura 3.3B) y HN+PAR (Figura 3.3C). Además, las muestras expuestas a la UVR mostraron un aumento considerable en el número de gránulos de almidón (Figuras 3.3D y E).

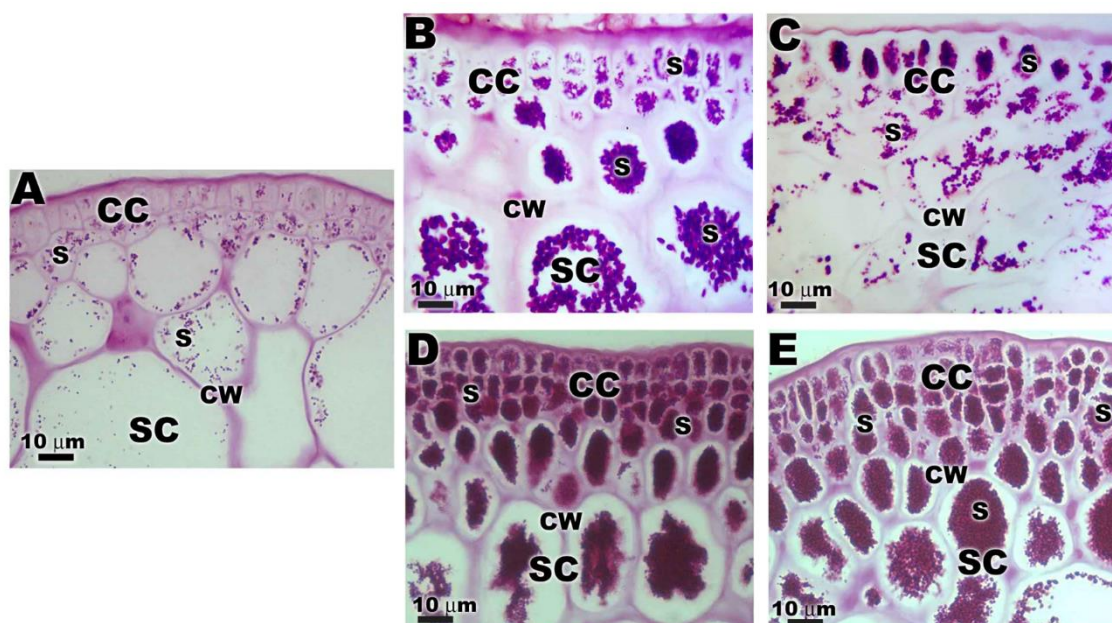


Figure 3.3. Microscopía óptica para los cortes transversales en talos de *G. longissima* teñidos con PAS tras 14 días sometidas a los distintos tratamientos. Obsérvese los gránulos de almidón (S) en las células corticales (CC), las células subcorticales (SC) y la reacción positiva con la pared celular (CW). Las muestras aclimatadas (A), LN+PAR (B), HN+PAR (C), LN+PAB (D) y HN+PAB (E).

3.3. Observaciones al Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM)

La observación de las muestras aclimatadas de *G. longissima* por TEM mostró células corticales rodeadas por una gruesa pared celular (Figura 3.4A-C), con cloroplastos (A-C) y algunos gránulos de almidón próximos a los cloroplastos (A-C). Los cloroplastos mostraron la típica organización interna no apilada de rodófitas, es decir, tilacoides uniformemente espaciados (Figura 3.4D-E). En los cloroplastos, se observaron algunos plastoglobuli entre los tilacoides (Figura 3.4E).

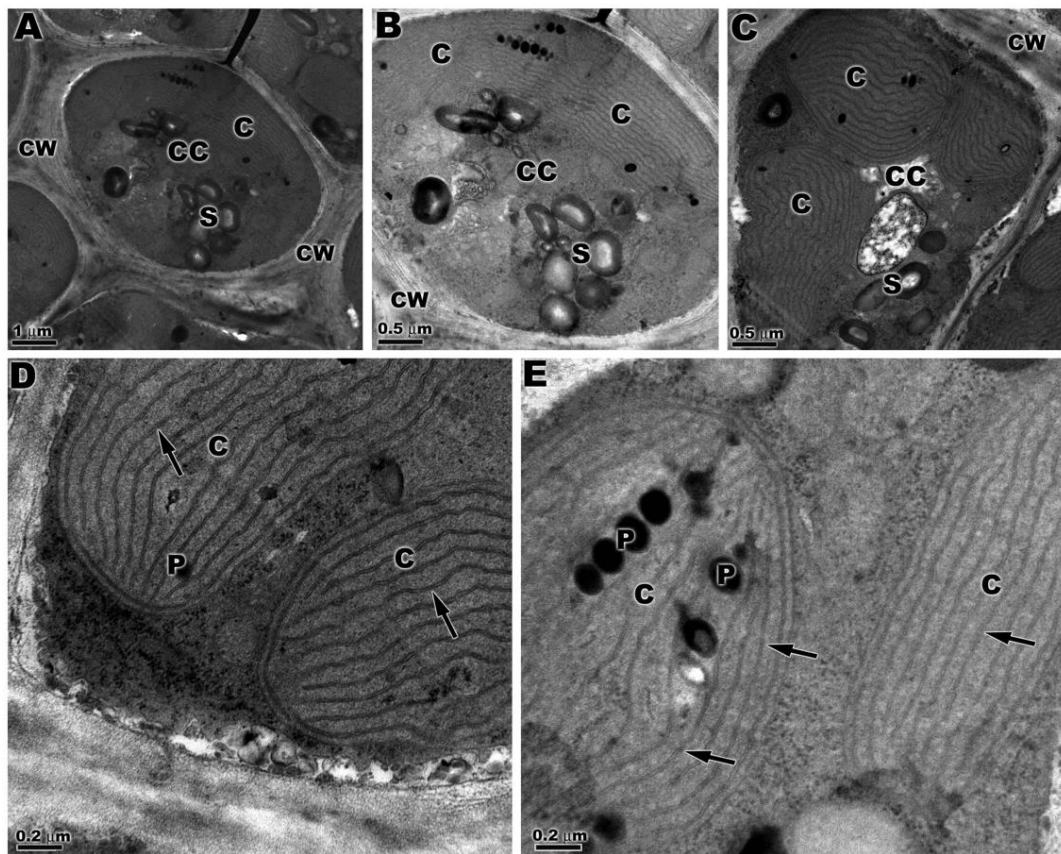


Figura 3.4. Microscopía electrónica de transmisión (TEM). Imágenes micrográficas de muestras **aclimatadas** en *G. longissima* (A-C). En resumen se muestra una célula cortical (CC) llena de numerosos cloroplastos (C) y algunos gránulos de almidón (S), rodeados por una engrosada pared celular (CW). (D-E). Detalle de los cloroplastos (C) que muestran una organización interna con tilacoides paralelos y periféricos (flechas). Obsérvese la presencia de plastoglobuli (P) en el cloroplasto.

Cuando se observaron bajo TEM, las muestras de *G. longissima* cultivadas con LN+PAR (Figuras 3.5A-B) no mostraron diferencias en la organización estructural en comparación con *G. longissima* en el tiempo de aclimatación (t_a). La región cortical mostró numerosos gránulos de almidón y algunos cloroplastos sufrieron engrosamiento de las membranas tilacoidales. Las muestras de *G. longissima* cultivadas bajo HN+PAR (Figura 3.5C-E) no presentaron diferencias en la organización estructural en comparación con las muestras aclimatadas y cultivadas bajo LN+PAR. La región cortical fue ocupada por cloroplastos, mitocondrias y rodeada por una pared celular engrosada (Figuras 3.5C-E). Sin embargo, después de la exposición a LN+PAB, *G. longissima* exhibió algunos cambios en la ultraestructura (Figuras 3.5A-D).

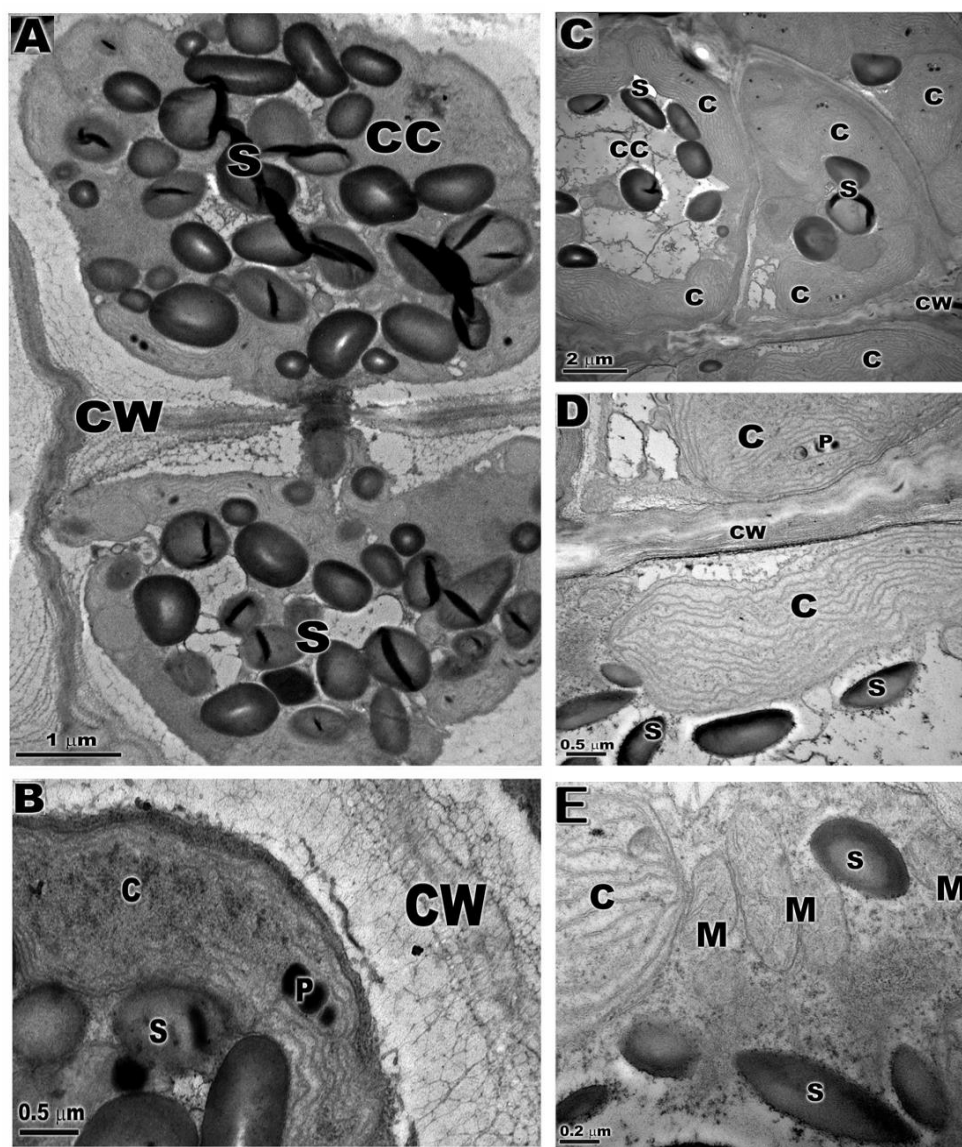


Figura 3.5. Microscopía electrónica de transmisión (TEM). Imágenes micrográficas de *G. longissima* tras 14 días de cultivo con LN+PAR (A-B) y HN-PAR (C-E). Imágenes A-B: Detalle de células corticales (CC) con gran cantidad de gránulos de almidón (S) y pared celular gruesa (CW). Obsérvese la presencia de cloroplastos (C), plastoglobuli (P) y gránulos de almidón en abundancia. Imágenes C-E: Presencia de cloroplastos (C) con plastoglobuli (P). Obsérvese el cloroplasto asociado a las mitocondrias (M).

Las células corticales se mostraron de forma irregular y con un notable aumento del grosor de la pared celular (Figura 3.6A), además de presentar una mayor cantidad de almidón (Figura 3.6A), corroborando así lo observado mediante microscopía óptica (LM). Además, los cloroplastos mostraron cambios visibles en la organización ultraestructural (Figura 3.6B). Los tilacoides se interrumpieron y el número de plastoglobuli aumentó en dichos orgánulos (Figura 3.6B). El núcleo no mostró ninguna modificación en cuanto a la organización de la membrana (Figura 3.6B).

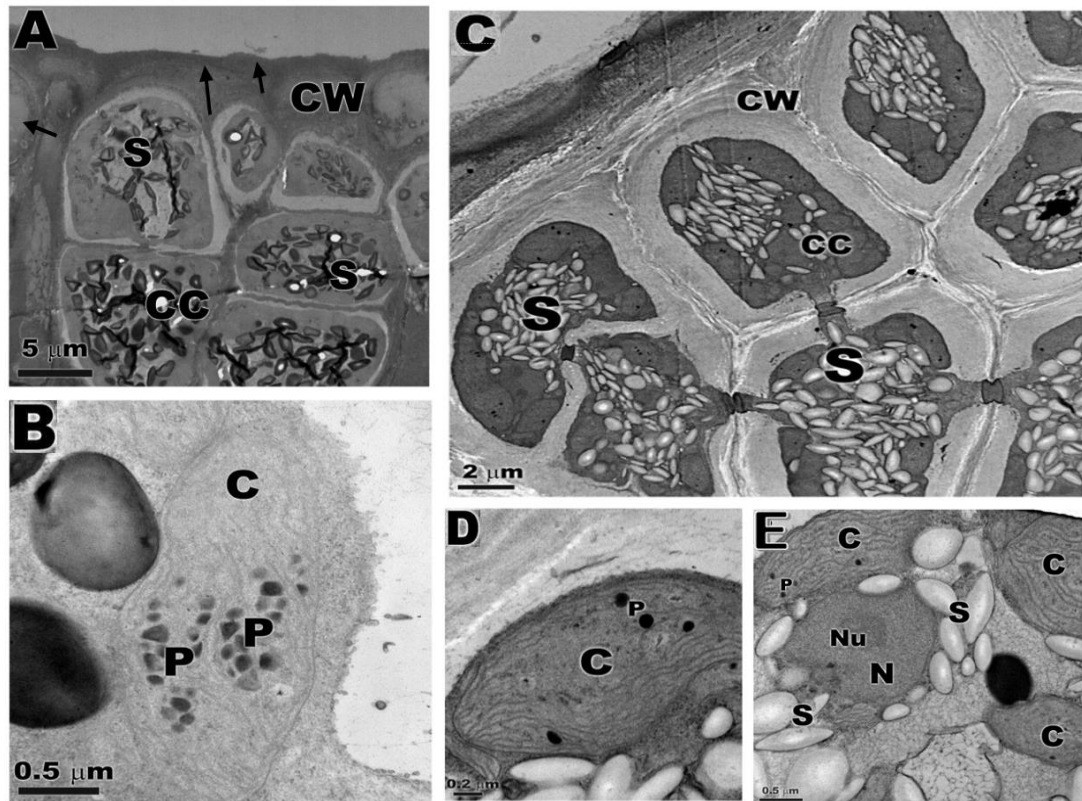


Figura 3.6. Microscopía electrónica de transmisión (TEM). Imágenes micrográficas de *G. longissima* tras 14 días de cultivo con **LN+PAB** (A-B) y **HN+PAB** (C-E). Imágenes A y C: detalle de las células corticales (CC) con gran cantidad de gránulos de almidón (S) y pared celular engrosada (CW). Obsérvese el grosor de la pared celular (flechas). Imagen B: Detalle del cloroplasto (C) alterado y presencia de plastoglobuli (P). Imagen D: Obsérvese el núcleo intacto (N) asociado con cloroplastos y plastoglobulis interrumpidos. Imagen E: Núcleo (N) y nucléolo (Nu) no muestran modificación.

El tratamiento HN+PAB también provocó cambios en la organización celular (Figura 3.6A). La pared celular tenía un aspecto compacto y con grandes cantidades de gránulos de almidón por todo el citoplasma (Figura 3.6E). Algunos cloroplastos fueron interrumpidos, las membranas tilacoidales se vieron engrosadas (Figuras 3.6B-E) y se incrementó el número de plastoglobuli (Figura 3.6D). El núcleo y el nucléolo no mostraron cambios después de la exposición a la UVR (Figura 3.6E).

3.4. Parámetros fotosintéticos y bio-ópticos

No se observó ningún efecto interactivo de la Luz y los Nutrientes (L x N) sobre el rendimiento cuántico máximo del PSII (F_v/F_m) (Tabla S.3.1). Este parámetro sólo se afectó por L, siendo los valores más altos en PAR (0.40 ± 0.03) que en PAB (0.27 ± 0.03) a diferente del experimento anterior, donde el F_v/F_m se mantuvo constante para esta especie. El F_v/F_m , como indicador de fotoinhibición, se correlacionó negativamente con el carbono interno total, los lípidos, los compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante ($p < 0.05$) (Tabla S.3.2).

La tasa máxima de transporte electrónico (ETR_{max}), fue influenciada por la interacción entre L x N ($p < 0.05$) (Tabla S.3.1). HN-PAB fue el único tratamiento en el que se mantuvo el valor inicial de ETR_{max} . En los otros tratamientos, el ETR_{max} disminuyó después de 14 días mostrando valores similares (Figura 3.7A). El ETR_{max} se correlacionó positivamente con los pigmentos fotosintéticos, los MAAs y el N interno (Tabla S.3.2). La irradiancia de saturación ($E_{k_{ETR}}$) se afectó tanto por L como por N, pero no se observó ningún efecto interactivo entre ambas variables (L x N). Los valores fueron más bajos en ausencia de UVR y mucho mayores en HN-PAB respecto a otros tratamientos (Figura 3.7B). La irradiancia de saturación ($E_{k_{ETR}}$) se correlacionó positivamente con la irradiancia óptima (I_m) y el contenido de MAAs y ficoliproteínas (Tabla S.3.2).

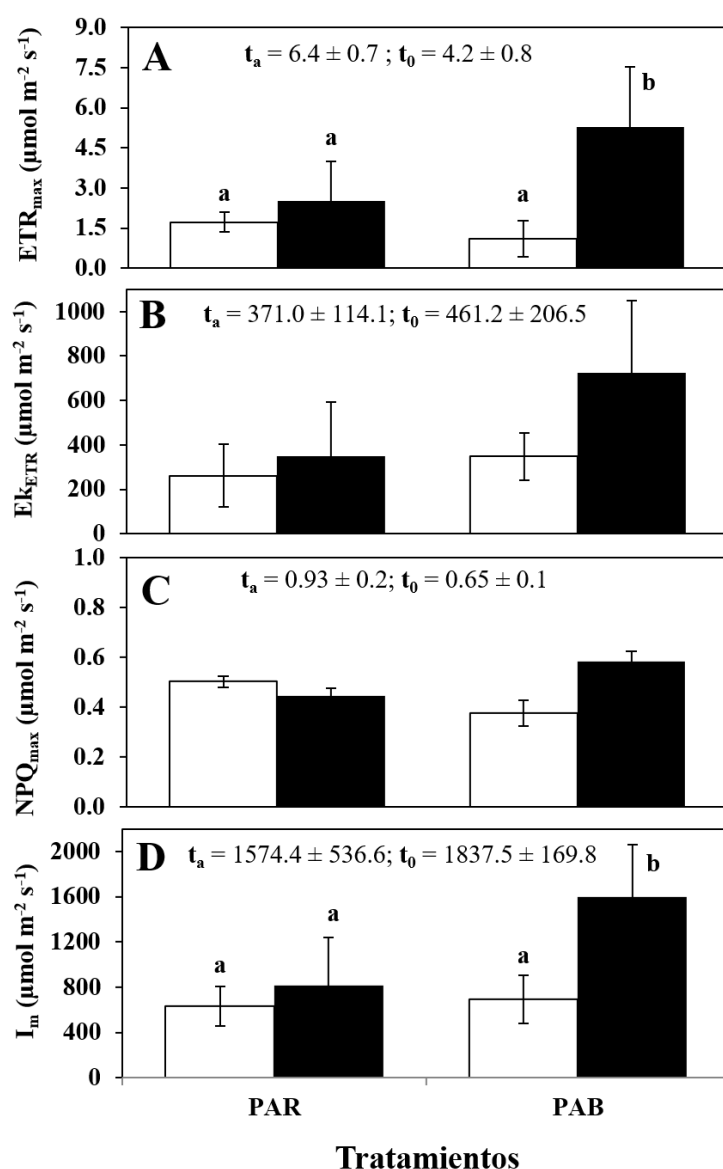


Figura 3.7. Parámetros fotosintéticos ETR_{max} (A), $E_{k_{ETR}}$ (B), I_m (C) y NPQ_{max} (D) en *G. longissima* en diferentes tratamientos bajo radiación PAR y PAB con bajo nutrientes (LN, barras blancas) y alto nutrientes (HN, barras negras) tras 14 días de cultivo. t_a es el tiempo de aclimatación y t_0 es el tiempo

inicial del experimento después de 7 días de privación de nutrientes. Las letras minúsculas sobre las barras indican diferencias significativas después de la prueba SNK ($p < 0.05$) en aquellos casos en los que la interacción L x N fue significativa.

El parámetro fotosintético I_m , resultó afectado por la interacción entre L y N ($p < 0.05$) (Tabla S.3.1). El valor más alto para I_m se observó en el tratamiento HN-PAB (Figura 8C). NPQ_{max} no resultó ser influenciado por ninguno de los tratamientos (Tabla S.3.1, Figura 3.7D) correlacionándose positivamente con los compuestos de N, como ficobiliproteínas y MAAs así como con el contenido de N interno (Tabla S.3.2). No se observó ningún efecto interactivo en L x N sobre la absorptancia (Tabla S.3.1). Este parámetro solo fue afectado por la disponibilidad de N (0.86 ± 0.01 en LN y 0.90 ± 0.01 en HN) y aumentó en todos los tratamientos con respecto al tiempo inicial (datos no mostrados).

3.5. Pigmentos fotosintéticos

Los niveles de Chla y de carotenoides totales no se vieron afectados por la interacción L x N, pero tanto L como N (como factores independientes) influyeron significativamente en su acumulación (Tabla S.3.1). Después de 14 días de cultivo, el contenido de pigmentos disminuyó en todos los tratamientos principalmente en LN-PAR con respecto a los valores iniciales (Tabla 3.1). Después de 14 d de cultivo, el contenido de Chla y de carotenoides permaneció igual que los valores iniciales (Tabla 3.1). El contenido de Chla se correlacionó positivamente con otros pigmentos como ficobiliproteínas y carotenoides, pero también con los MAAs ($p < 0.05$) (Tabla S.3.2). Los carotenoides totales aumentaron en *G. longissima*, alcanzando los valores más altos en presencia de nutrientes y los valores más bajos se dieron bajo UVR.

Tabla 3.1. Contenido pigmentario en *Gracilariopsis longissima* tras 14 días de cultivo bajo dos condiciones de irradiación PAR y PAB (PAR + UVR) y dos tratamientos de nutrientes (bajo nutrientes: LN y alto nutrientes: HN) en comparación con el tiempo de aclimatación (t_0), y tras 7 días de hambre de nitrógeno (inicial). NP es "nitrógeno del medio de Provasoli" y -N es "sin adición de nutrientes durante 7 días".

mg g ⁻¹ PS	Aclimatación	Inicial	14 días			
	PAR	PAR	PAR		PAB	
	NP	-N	LN	HN	LN	HN
Chla	1.17 ± 0.1	0.87 ± 0.2	0.38 ± 0.1	0.55 ± 0.06	0.45 ± 0.02	0.63 ± 0.07
Carotenoides	0.2 ± 0.01	0.19 ± 0.09	0.1 ± 0.01	0.17 ± 0.02	0.21 ± 0.03	0.24 ± 0.06
Ficocianina	4.3 ± 0.3	4.5 ± 0.2	3.6 ± 0.2	4.2 ± 0.3	4.1 ± 0.4	5 ± 0.3
Ficoeritrina	17.9 ± 1.0	17.3 ± 0.9	8.5 ± 0.4	14.8 ± 2.0	10.7 ± 1.2	17.7 ± 0.9

Los datos son mostrados como Promedio ± S.D. para n = 3

El contenido de ficoeritrina (FE) fue mayor que el de la ficocianina (FC) en el momento inicial. Bajo el agotamiento de nutrientes, la proporción de FC/FE disminuyó como consecuencia de la reducción del contenido de FE (Tabla 3.1). Tanto L como N, afectaron significativamente el contenido de FC, sin que se observara interacción entre ambos factores (Tabla S.3.1). Los nutrientes afectaron significativamente la acumulación de FE (Tabla S.3.1). Ambos pigmentos accesorios mostraron los valores más elevados bajo HN (Tabla 3.1). Estas ficobiliproteínas se correlacionaron positivamente con el resto de pigmentos fotosintéticos y también con la capacidad antioxidante (Tabla S.3.2).

3.6. Composición elemental y compuestos bioquímicos

El contenido de carbono interno (C) aumentó en todos los tratamientos con respecto al tiempo de aclimatación (t_a) y al tiempo inicial (t_0). Este elemento resultó influenciado por la interacción entre L y N ($p < 0.01$) (Tabla S.3.1, Figura 3.8A). El contenido de C se correlacionó con los compuestos fenólicos, con el almidón y con los lípidos totales (Tabla S.3.2). Sin embargo, el contenido de N también se afectó por L y N pero como factores independientes (Figura 3.8B) (Tabla S.3.1). La relación C/N (Figura 3.8C) aumentó con el tratamiento con N en PAR y PAB siendo más alto en LN-PAR.

Los niveles de proteínas solubles se vieron afectados por la interacción de L x N ($p < 0.05$) (Tabla 3.2). Los valores más altos se observaron en los tratamientos con alta disponibilidad de N (HN-PAR y HN-PAB). También se observó un aumento del 66.4% en el tratamiento LN-PAB con respecto a LN-PAR. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre ambos tratamientos de radiación (HN-PAR y HN-PAB) (Tabla 3.2). El contenido total de N se correlacionó fuertemente con los compuestos que contienen N en su composición (es decir, ficobiliproteínas, proteínas y MAAs), así como con el contenido en compuestos fenólicos, lípidos y carotenoides (Tabla S.3.2).

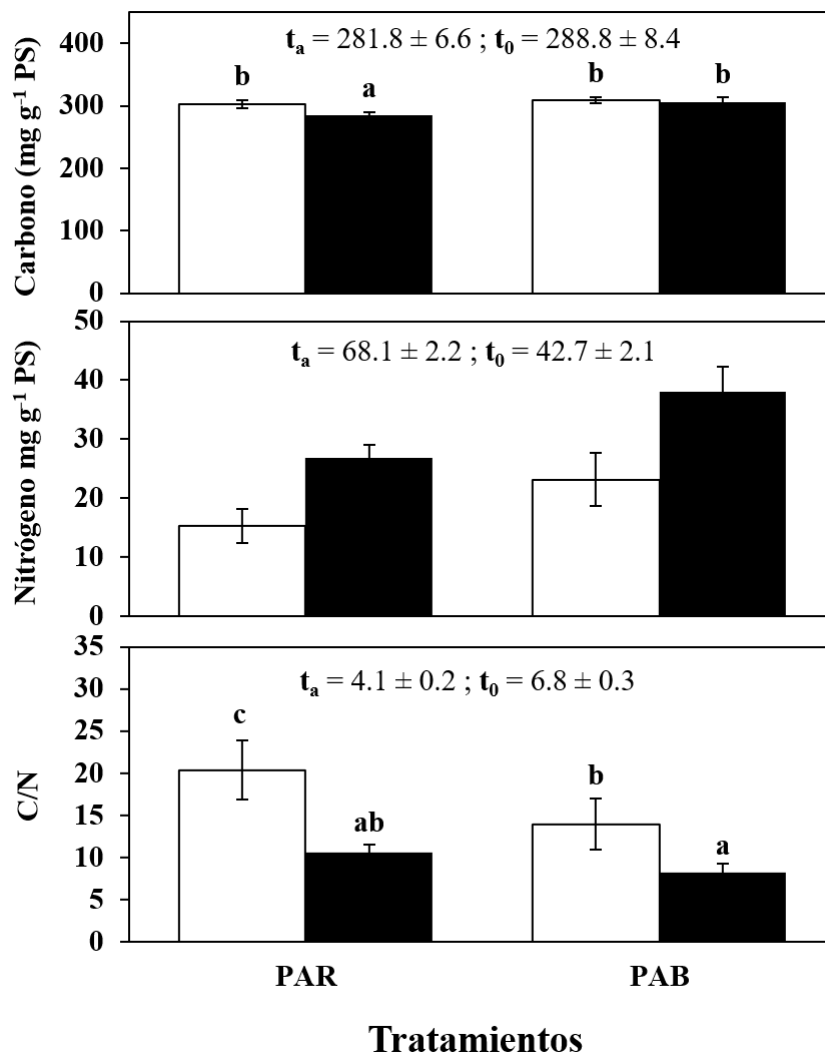


Figura 3.8. Contenido de carbono interno (A) y nitrógeno (B) expresado como mg g⁻¹ PS y C/N (C) en *Gracilariopsis longissima* en diferentes tratamientos bajo radiación PAR y PAB con bajo nutrientes (LN, barras blancas) y alto nutrientes (HN, barras negras) tras 14 días de cultivo. t_a es el tiempo de aclimatación y t_0 es el tiempo inicial del experimento después de 7 días de privación de nutrientes. Las letras minúsculas sobre las barras indican diferencias significativas después de la prueba SNK en aquellos casos en los que la interacción de factores fue significativa ($p < 0.05$).

No se observó ningún efecto interactivo en L x N para el contenido de almidón (Tabla S.3.1). Sin embargo, L y N como factores independientes, sí afectaron a este contenido ($p < 0.05$). El mayor valor de almidón se observó en los tratamientos con LN, siendo mayor en PAB que en PAR (Tabla 3.2). El contenido de almidón se correlacionó positivamente con los compuestos fenólicos y con la capacidad antioxidante, pero negativamente con la viabilidad celular (Tabla S.3.2). El contenido de lípidos sólo se afectó por influencia de L (Tabla S.3.1) observándose los niveles más altos en los tratamientos PAB (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Compuestos bioquímicos en *Gracilariopsis longissima* tras 14 días de cultivo bajo dos condiciones de irradiación PAR y PAB (PAR + UVR) y dos tratamientos de nutrientes (bajo nutrientes: LN y alto nutrientes: HN) en comparación con el tiempo de aclimatación (t0), y tras 7 días de hambre de nitrógeno (inicial). NP es "nitrógeno del medio de Provasoli" y -N es "sin adición de nutrientes durante 7 días".

Variables	Aclimatación	Inicial	14 días			
	PAR	PAR	PAR		PAB	
	NP	-N	LN	HN	LN	HN
Carbohidratos	105.8 ± 9.3	275.8 ± 94.8	172.9 ± 40.6	122 ± 27.1	252.4 ± 36.7	174.2 ± 38.6
Lípidos	6.1 ± 1.4	16.7 ± 7.5	37.3 ± 2.4	35.6 ± 11.3	46.4 ± 10	46.2 ± 6
Proteínas	181.7 ± 25.1	185.7 ± 27	43.4 ± 19.2 ^a	189.4 ± 10.3 ^c	129 ± 34.3 ^b	179.4 ± 7.3 ^c
C. Fenólicos	7 ± 0.1	6 ± 0.5	7.8 ± 1.3 ^a	8.3 ± 0.5 ^a	13.2 ± 1.6 ^b	9.5 ± 0.2 ^a
MAAs totales	0.48 ± 0.07	0.33 ± 0.12	0.23 ± 0.0 ^a	0.27 ± 0.1 ^a	0.26 ± 0.1 ^a	0.69 ± 0.0 ^b
Antioxidantes	19 ± 4.2	29.3 ± 3	21.2 ± 3.3 ^a	22 ± 0.9 ^a	28.4 ± 3.6 ^b	24.4 ± 0.9 ^a
VC (%)			37.1 ± 0.9	51.7 ± 0.7	27.5 ± 0.7	43.7 ± 0.5

El contenido en carbohidratos, lípidos, proteínas, compuestos fenólicos y MAAs totales, se expresaron como mg g⁻¹ PS.

El contenido de antioxidantes se expresó como μmol TEAC g⁻¹ PS.

Los datos son mostrados como Promedio ± S.D. para n = 3, excepto.

Las letras minúsculas indican diferencias significativas para la interacción (L x N) después de las pruebas SNK (ver "Materiales y métodos").

Los compuestos fenólicos se vieron afectados por la interacción entre L x N ($p < 0.05$) (Tabla S.3.1). Los valores máximos se encontraron en el tratamiento LN-PAB. Para otros tratamientos, el contenido en estos compuestos resultó similar (Tabla 3.2). Los compuestos fenólicos se correlacionaron positivamente con la capacidad antioxidante y también con otros componentes como los lípidos, carbohidratos, carotenoides y MAAs (Tabla S.3.2).

Los MAAs se vieron afectados por la interacción entre L x N ($p < 0.01$) (Tabla S.3.1). Los valores máximos se observaron en el tratamiento con HN-PAB (0.69 mg g⁻¹ PS), tres veces mayor que en los otros tratamientos, en los que se observaron cantidades iguales (alrededor de 0.24 mg g⁻¹ PS) (Tabla 3.2). No se encontraron cambios entre las proporciones de MAA en los diferentes tratamientos (datos no mostrados). Los MAAs se correlacionaron positivamente con los compuestos fenólicos y con las proteínas, pero no se encontró una correlación significativa con la capacidad antioxidante (Tabla S.3.2).

3.7. Capacidad antioxidante

No se observó efecto interactivo de L x N para la capacidad antioxidante en *G. longissima* (Tabla S.3.1). Esta variable solo fue afectada por L, siendo los valores más altos en PAB que en el PAR (+21%) (Tabla 3.2). La capacidad antioxidante se correlacionó positivamente con el contenido de sustancias antioxidantes potenciales, como carotenoides, ficobiliproteínas, compuestos fenólicos,

carbohidratos y lípidos, mientras que se correlacionó negativamente con la viabilidad celular (Tabla S.3.2).

3.8. Viabilidad celular

La viabilidad celular (VC%) No se observó ningún efecto interactivo entre L y N para la viabilidad celular (Tabla S.3.1). La luz y los nutrientes afectaron a esta variable, pero como factores independientes (Tabla 3.2). La viabilidad celular aumentó en el tratamiento HN-PAR y se correlacionó negativamente con el contenido de compuestos fenólicos y con la capacidad antioxidante (Tabla S.3.2).

4. Discusión

Gracilariopsis longissima respondió en líneas generales a la interacción entre la disponibilidad de nutrientes en el medio y a la exposición a la UVR, estimulando el metabolismo secundario y la capacidad antioxidante, manteniendo una alta producción fotosintética así como cambios estructurales sutiles en orgánulos a nivel celular. Varios autores estudiaron cómo la acumulación de nitrógeno (N) influye en la síntesis de compuestos con capacidad antioxidante y fotoprotectora a la UVR como es el caso de los MAAs (Korbee et al. 2010) y también aumentando la capacidad antioxidante a través de las enzimas endógenas (Zhang et al. 2010), ficobiliproteínas (Liotenberg et al. 1996) y otros compuestos algales. Sin embargo, altas irradiancias de UVR, pueden ejercer efectos nocivos al causar un aumento desmesurado del estrés oxidativo a nivel celular (De Mora et al. 2000). Mediante el uso de diferentes funciones biológicas ponderadas o espectros de acción (Material y métodos generales, Tabla M.1), se evaluaron los efectos potenciales del daño biológico como la fotoinhibición de cloroplastos, la inhibición de la fotosíntesis, el daño en el ADN y la peroxidación de lípidos, siendo estos mucho más altos (4-67 veces) bajo PAB que bajo PAR.

4.1. Morfología y ultraestructura: relación con la fisiología

Estudios previos han demostrado que las rodófitas responden a un aumento de la UVR aumentando o engrosando la pared celular, y excretando polisacáridos que conforman una matriz extracelular (Schmidt et al. 2010). Esto se considera como una defensa física, la cual prevendría de la penetración de la UVR (Hollósy 2002). Este patrón probablemente estimule la actividad bioquímica del aparato de Golgi, induciendo a la formación de vesículas, las cuales contienen fibras que formarían parte de la matriz polimérica de la pared celular. Staxen & Bornman (1994), publicaron que los microtúbulos podrían estar involucrados en la deposición de microfibrillas que las cuales son despolimerizadas bajo UVR. La interrupción de la actividad de los microtúbulos en las células

corticales puede resultar en alteraciones de la morfología celular y en consecuencia, los talos se verían alterados mostrando una morfología como la observada en *G. longissima* para este estudio.

En estudios histológicos, la reacción TB-O se utiliza como indicador de polisacáridos ácidos (Gordon-mills et al. 1978). El TB-O reacciona químicamente con los grupos carboxilo y sulfato (McCully 1968). Probablemente, debido a la configuración terciaria de cada polianión sulfatado, el polímero forma un complejo diferente con el TB-O (Gordon & McCandless 1973). Los ficocoloides de la pared celular de *G. longissima* parecen ser ricos en grupos sulfato debido a la intensa reacción que el TB-O origina, siendo la reacción más intensa en los tratamientos expuestos a UVR. Bajo la influencia de la UVR, el espesor de las paredes aumentó, impidiendo la identificación de diferencias en las reacciones metacromáticas. Por otra parte, el ensayo PAS se utiliza para identificar polisacáridos neutros como son los gránulos de almidón. Este compuesto PAS, requiere de la presencia de grupos 1,2-glicol los cuales son oxidados a aldehídos mediante ácido peryódico (Trick & Pueschel 1990). *G. longissima* mostró una fuerte reacción con PAS bajo UVR (tanto en alta como en baja disponibilidad de nutrientes), la cual indica un gran acúmulo de gránulos de almidón como polisacárido de reserva principal. Sin embargo, la reacción fue menos intensa en las paredes celulares expuestas a los tratamientos PAR, y mucho menos en el momento de la aclimatación de las algas (t_a).

Por otra parte, cuando las células se observaron por microscopía de transmisión (TEM), se encontraron numerosos cloroplastos rodeados por unos pocos gránulos de almidón y una pared celular engrosada. Los cloroplastos mostraron estructuras microfibrilares con capas concéntricas de diferentes grados de compresión. La producción de componentes fibrilares en la pared celular es similar en muchas rodófitas y parece ser causada por grandes vacuolas fibrosas, por el retículo endoplasmático y posteriormente por la adición de vesículas derivadas del aparato de Golgi (Bouzon 2006). En los tratamientos PAR, las micrografías mostraron numerosos gránulos de almidón. En los tratamientos con limitación de nutrientes independientemente del tratamiento lumínico, la síntesis de polisacáridos (gránulos de almidón y pared celular) se incrementó de acuerdo con los resultados obtenidos por Arad et al. (1988).

Bajo UVR, los gránulos de almidón aumentaron considerablemente. Este mismo aumento se ha observado en otras especies de rodófitas (Schmidt et al. 2010; 2012a). La gran acumulación se debe probablemente a la imposibilidad de movilización de estas moléculas carbonadas por cambios en las membranas tilacoidales de los cloroplastos (Malanga et al. 1997), además de la modificación en la permeabilidad y/o los cambios enzimáticos, lo que redundaría en una menor eficiencia o en una disminución del proceso fotosintético. En condiciones donde la viabilidad celular era menor debido al estrés (es decir, los tratamientos LN-PAR y LN-PAB), el contenido de almidón aumentó en un 26.4% y un 39.9%, respectivamente con respecto a las condiciones iniciales donde no hubo carencia

nutricional. Sin embargo, en los tratamientos sin limitación de nutrientes (HN), el contenido disminuyó en un 10.3% y sólo aumentó en un 12.6% en el tratamiento con HN-PAB. El contenido máximo de almidón se alcanzó al comienzo del experimento siendo estos resultados consistentes con los encontrados por Mouille et al. (1996), los cuales indicaron que las reservas de almidón en rodófitas, se concentran en las células fotosintéticas subcorticales. Cuando *G. longissima* estuvo expuesta a UVR, se observó un aumento cuantitativo de almidón en células subcorticales (154.8 ± 4.9 y 106.4 ± 10.5 en LN-PAB y HN-PAB, respectivamente). El aumento del contenido de almidón, como reserva del carbono fotosintético no utilizado para el crecimiento, puede deberse a una inducción por parte de UVR (Ballaré et al. 1996). Este estudio confirma que en aquellos tratamientos en los que se observaron gránulos de almidón (tanto en LM como en TEM), el contenido de C elemental en la biomasa es mayor como consecuencia de una alta concentración de almidón almacenado. Este argumento se refuerza cuando *G. longissima* muestra una mayor viabilidad celular (mejor estado fisiológico) disminuyendo el contenido de almidón. Esto demuestra en *G. longissima*, que los polisacáridos de reserva se acumulan en la célula cuando las condiciones son adversas por eso se observa una correlación positiva con la viabilidad celular en este estudio. (Tabla S.3.2).

En los tratamientos bajo UVR, las estructuras de conexión entre células “pit conection”, típicas en rodófitas, parecen modificadas y desestructuradas a nivel de las membranas. Sin embargo, como se describió anteriormente, los núcleos celulares resultaron intactos (Tsekos 1983). De hecho, la división celular en *G. longissima* permanece incompleta debido a la permanencia de dichas conexiones. Una explicación plausible podría ser que, durante la fase final de la división celular y por acción de la UVR, permanecen poros entre las dos células hijas y estos sean bloqueados por la deposición de una sustancia de naturaleza proteica (Pueschel 1980). Además, en *G. longissima*, puede observarse en la micrografía como un gránulo de almidón se encontró atravesando un pit conection, lo cual indicaría que los pit conection también son utilizados en esta especie como un sistema de transporte entre células. En contraste, los núcleos no se vieron alterados por la exposición a UVR, lo cual proporciona información de que bajo estas condiciones (UVR y baja disponibilidad de nutrientes), por lo tanto el ADN de *G. longissima* resiste al total de KJ proporcionados por las lámparas Q-Panel empleadas en este estudio, siendo necesario destacar que esta longitud de onda empleada es más larga y diferente que la empleada en estudios donde sí se observó daño en el ADN. El material genético de *G. longissima* queda intacto indicando una gran resistencia a estos estresores (Poppe et al. 2003).

La presencia de numerosos cloroplastos podría estar relacionada con una alta tasa de replicación para la síntesis de proteínas endógenas. Los cloroplastos, bajo los tratamientos PAR, muestran una estructura típica en la que los tilacoides periféricos son paralelos entre sí. Por el contrario, cuando *G. longissima* se expuso a UVR, los cloroplastos mostraron modificaciones estructurales significativas, incluyendo cambios en el tamaño, en el número y en la organización de los mismos. Por

lo tanto, para sobrevivir en ambientes donde la luz cambia constantemente, las rodófitas han desarrollado estrategias de adaptación que implican cambios en la anatomía del talo y en la pared celular, diferencias en la morfología de los cloroplastos y en la organización tilacoidal así como en el tamaño y número de ficobilisomas (Talarico & Maranzana 2000).

Los plastoglobulis son vesículas cuya función principal es la acumulación de material lipídico como función de reserva y mantener la conformación tilacoidal. Bajo exposición a UVR y bajos niveles de N, el número de plastoglobulis aumentó considerablemente. Esto es consistente con los valores cuantificados de lípidos totales en este estudio ($\approx 46 \text{ mg g}^{-1}$ PS para tratamientos con UVR). Se han reportado resultados similares por Holzinger et al. (2004) en *Palmaria palmata* y *Odonthalia dentata* después de la exposición a UVR. Bajo condiciones de LN-PAB, *G. longissima* aumentó el contenido de lípidos pero no significativamente, en comparación con los tratamientos donde los nutrientes no son limitantes, ya que el N es el nutriente que más afecta e induce el metabolismo lipídico en algas cuando no se encuentra disponible (Sharma et al. 2012). El tratamiento sin adición de nutrientes conduce a una disminución de la división celular pero la biosíntesis de los ácidos grasos permanece intacta en algunas especies de algas en tales condiciones, siempre y cuando la fotosíntesis sea óptima (Thompson 1996). Dado que la fotosíntesis no se interrumpe bajo estas condiciones, el NADPH se canaliza hacia la síntesis de ácidos grasos previniendo el daño celular que podría generar un exceso de poder reductor (Hu et al. 2008). Otros estudios muestran cómo la radiación UVA promueve la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs); 37.3% al 41.3% (en relación con los ácidos grasos totales) (Liang et al. 2006). Estos PUFAs son sensibles a la oxidación inducida por UVR por lo que si la radiación aumenta, aumentaría la síntesis de estos ácidos grasos (AG) (Stabili et al. 2012). En *G. longissima*, los PUFAs, presentados a altas concentraciones (Stabili et al. 2012), podrían aumentar la síntesis de AG para ser utilizados como requerimientos celulares después de ser degradados por las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas por exposición a UVR. Aun así, los mecanismos inductores para la síntesis de lípidos no han sido tratados todavía en profundidad para macroalgas a pesar de que en microalgas y diatomeas sí se han realizado números estudios en este ámbito (Sharma et al. 2012).

4.2. Estado fisiológico: fotosíntesis y viabilidad celular

El estado fisiológico se puede inferir mediante el ensayo MTT para la determinación de la viabilidad celular (Mosmann 1983). Se observó que en el tratamiento LN-PAB (baja viabilidad celular, por lo tanto peor estado fisiológico), el contenido de compuestos antioxidantes medidos por el ensayo ABTS, aumentó en respuesta a factores de estrés. El estrés producido por los bajos niveles de N y por la presencia de UVR, que actúan sinérgicamente como factores de estrés abióticos, aumentarían la producción de ROS lo que generaría un daño oxidativo a nivel celular. Este daño puede afectar la permeabilidad de las membranas celulares y a la peroxidación lipídica, al daño enzimático del ADN o la reducción de la tasa fotosintética (Shiu & Lee 2005) así como al daño ultraestructural como se

observó en este estudio para *G. longissima*. Por lo tanto, el estrés generado por la interacción de ambos factores (LN y PAB) condujo al metabolismo hacia la síntesis de compuestos con actividad antioxidante en *G. longissima*. Zubia et al. (2014) observó resultados similares en *Gracilariopsis tenuifrons*.

En macroalgas, el fotosistema II (PSII) es a menudo dañado por la UVR (Vass et al. 2005). Sin embargo, se observó que los parámetros fotosintéticos como ETR_{max} y F_v/F_m sólo disminuyeron bajo los tratamientos con baja disponibilidad de N (LN-PAR y LN-PAB), esto estaría relacionado con el hecho de que más del 50% del N absorbido se utiliza para los requerimientos bioquímicos del aparato fotosintético (Makino & Osmond 1991). Por lo tanto, bajo un déficit de este elemento, la producción disminuye considerablemente. En el tratamiento PAR, el aumento de la productividad (ETR_{max}) en HN con respecto a LN fue de aproximadamente el 57.1%. En los tratamientos bajo UVR, este aumento fue aún mayor (71.4%). Los resultados de este estudio coinciden con los obtenidos por Barufi et al. (2011) en *Gracilaria tenuistipitata* bajo irradiación de 8.13 W m⁻² de UVA y 0.42 W m⁻² de UVB. Hanelt et al. (2006) y Pessoa (2012) explicaron que la fotoinhibición ocurre cuando el mecanismo de fotoprotección no logra mitigar la fotoinactivación. Esto ocurre cuando el daño a las proteínas del centro de reacción excede la capacidad de PSII para activar los mecanismos de fotorreparación originados por la UVR. Además, niveles bajos de N no satisfarían las demandas de este elemento para el proceso fotosintético. La susceptibilidad a la fotoinhibición es mayor en las plantas cultivadas con limitación de nutrientes, que bajo las cultivadas con alta disponibilidad (Grassi et al. 2001). Sin embargo, los efectos positivos de los nutrientes y de la UVR en la fotoinhibición permiten mantener la irradiancia de óptima cercana a las condiciones iniciales en HN-PAB (1837 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$). De forma similar, aunque no interactivamente, la radiación PAB y la alta disponibilidad de N en *G. longissima* permiten la adaptación a altas irradiancias, es decir, el aumento de los valores de $E_{k_{ETR}}$ como aclimatación típica de plantas con ecotipo sol.

Así pues, la disminución de la capacidad fotosintética se produce cuando hay una disminución de N atribuible a una disminución de las enzimas involucradas en el ciclo de Calvin (Sugiharto et al. 1990). Además, los mecanismos de reparación frente a la UVR inducida por daños en los componentes del transporte electrónico, producen un aumento en la demanda enzimática, lo que lleva a una mayor necesidad de N (Poppe et al. 2003). Un ejemplo sería la demanda de las proteínas fotosintéticas principales, como RuBisCo o proteína D1. Hay estudios que han demostrado un aumento de esta demanda bajo UVR lo cual provocaría una disminución en la capacidad fotosintética (Strid et al. 1994).

Otro indicador de la capacidad de fotoaclimatación es la disipación de energía (relacionado con el parámetro de amortiguamiento no fotoquímico: NPQ), permitiendo a los organismos fotosintéticos hacer frente al exceso de energía de excitación (Pandey et al. 1997). Valores más altos

de este parámetro están relacionados con una activación de los mecanismos fotoprotectores que estarían estrechamente vinculados con el ciclo de xantofilas (Demmig-Adams & Adams 1996). *G. longissima* mostró una mayor disipación de energía en el tratamiento HN-PAB respecto a los otros tratamientos a los 14 días, lo que indica la activación de estos mecanismos disipadores regulados a nivel celular.

4.3. Compuestos bioquímicos

En *G. longissima* se observó una interacción significativa entre la luz y los nutrientes en la acumulación de proteínas solubles, MAAs, dentro de los compuestos nitrogenados, pero también los compuestos carbonados como los compuestos fenólicos se vieron afectados. En general, una serie de factores estresantes, incluyendo la UVR, tienden a aumentar las concentraciones de proteínas solubles. Si bien estos cambios bioquímicos a menudo reflejan la aclimatación fisiológica de *G. longissima* a niveles de UVR más elevados, lo cual puede tener consecuencias positivas o negativas para la calidad en términos de nutrición y uso comercial de los productos obtenidos que se deriven (Bornman et al. 2015). Así, en el caso de las proteínas solubles, el efecto de la UVR parece estar enmascarado bajo un alto contenido de nutrientes.

En este estudio, el contenido de Chla aumentó con el enriquecimiento de nutrientes, lo que sugiere que los complejos de proteína-clorofila en *G. longissima* pueden servir como proteína de almacenamiento. Esto se refuerza mediante la correlación observada entre el contenido de Chla y el contenido de proteínas solubles. De hecho, el aumento de Chla relacionado con un aumento interno de N ya se ha demostrado en *Gracilaria tikvahiae* y *Gracilariopsis tenuifrons* (Bird et al. 1982; Zubia et al. 2014). Por otra parte, la Chla disminuyó en condiciones limitantes de nutrientes, lo que conduce a una disminución de la concentración de RuBisCo (Jones et al. 1996).

Es bien sabido que las ficobiliproteínas son un importante reservorio de N en rodófitas y cianobacterias. Numerosos estudios muestran que el contenido de estos pigmentos se correlaciona con la disponibilidad de N (Jones et al. 1996) tal y como se ha observado en este estudio, donde el contenido de estos pigmentos aumentó significativamente en tratamientos con alta disponibilidad de nutrientes. Las ficobiliproteínas también presentan un rol fotoprotector, por lo que están influenciadas por la UVR (Boulay et al. 2008). Estos pigmentos accesorios contienen grupos tetrapirrol que pueden ser destruidos por la UVR (Pandey et al. 1997). En este estudio, las ficobiliproteínas en *G. longissima* no fueron degradadas bajo UVR bajo condiciones de alto N pero ante una baja disponibilidad de N, el contenido de ficobiliproteínas se redujo significativamente en esta especie. Este mismo patrón se observó en *Porphyra* sp. para un experimento similar (Korbee et al. 2004b). En resumen, los efectos interactivos de N y UVR promueven la síntesis y acumulación de ficobiliproteínas probablemente con fines fotoprotectores en *G. longissima*.

La síntesis de compuestos fenólicos puede ser inducida debido a la acción de diferentes factores dotando a los compuestos fenólicos de varios roles ecológicos. Entre todas estas funciones, los compuestos fenólicos son moléculas que absorben UVR y que presentan una gran capacidad antioxidante, lo cual serviría como fotoprotector en los organismos fotosintéticos. Además, el contenido en las especies depende de la disponibilidad de N en el medio (Pavia & Toth 2000). En presencia de UVR (LN-PAB y HN-PAB), los valores de los compuestos fenólicos son superiores a los encontrados en PAR, pero sólo fue significativo en el tratamiento LN-PAB (13.2 mg g⁻¹ PS). Schmidt et al. (2012b) observaron en *Hypnea musciformis*, un aumento del 37% en los compuestos fenólicos después de la exposición a UVB. Además, recientemente se han encontrado compuestos nitrogenados bromofenólicos en *Osmundaria colensoi* y *Rhodomela confervoides*, los cuales parecen ser estimulados por UVR y por la disponibilidad de N en el medio. Esto apuntaría a que también podrían tener un rol como reservorio de N (Qu et al. 2014), al igual que otras moléculas como los MAAs y las ficobiliproteínas (Korbee et al. 2004b).

Estudios previos han demostrado como la UVR o altas irradiancia de PAR en combinación con alta disponibilidad de N, inducen la acumulación de fotoprotectores (MAAs) en rodófitas (Korbee et al. 2004b), incluyendo Gracilariales (Korbee et al. 2010) entre los que se encuentran el género *Gracilariopsis* (Torres et al. 2016). En este estudio, los MAAs totales aumentaron en los tratamientos PAB (tanto LN como HN), aunque este aumento sólo fue significativo en el tratamiento bajo UVR y con alta disponibilidad de N (65% más de aumento en comparación con otros tratamientos). Así pues, se encontró un efecto interactivo entre N y UVR de acuerdo a otros resultados reportados por Korbee et al. (2004) en *Porphyra* sp. El contenido más alto de MAAs observado en el tratamiento con HN+PAB, puede producir una fotoprotección eficaz debido tanto a la fotoprotección a UVR, como a la capacidad antioxidante de estas moléculas que reduzcan los ROS generados por el estrés metabólico (De La Coba et al. 2009).

La relación estequiométrica C/N, como ya se ha visto en los **Capítulos 1 y 2**, es buen un indicador del estado fisiológico en algas y es indicativo del potencial metabólico para la síntesis de biomoléculas (Lindroth 2010). La elevada relación C/N sugiere una producción menos favorecida de metabolitos orgánicos a partir de nutrientes, ya que la absorción de N no es suficiente para favorecer el aumento de las tasas de crecimiento (Duarte 1992), tal como se observa y se corrobora en este estudio para *G. longissima*. Esto se observó a través de la disminución del contenido de ficobiliproteínas, Chl_a, carotenoides, MAAs totales, compuestos fenólicos, lípidos y proteínas bajo una disponibilidad reducida de nutrientes, especialmente N. Sin embargo, en relación con el contenido de compuestos antioxidantes, Ibrahim & Jaafar (2011) encontraron en plantas terrestres, que bajas cantidades de N y por lo tanto una alta relación C/N, estaban relacionadas con la acumulación de metabolitos secundarios. Sorprendentemente, altas dosis de UVR mostraron menores relaciones C/N en las especies estudiadas.

Por lo tanto, se puede inferir que la UVR aumenta la acumulación de N y por ende las tasas de crecimiento de *G. longissima*. La productividad de *G. longissima* parece estar regulada más por la disponibilidad de nutrientes, pudiendo aliviar eficientemente el fotodaño si la cantidad de nutrientes es alta en el medio.

Los parámetros fotosintéticos se correlacionaron positivamente con el contenido de N (excepto F_v/F_m) y con los pigmentos fotosintéticos (ficobiliproteínas y Chl*a*), lo que indica una relación directa entre este nutriente y la capacidad fotosintética de esta especie como ya se ha reportado en *Gracilaria tenuistipitata* (Barufi et al. 2011). Además, este aumento en la producción fotosintética conduce a un aumento en el contenido de MAAs totales.

La correlación negativa encontrada entre la capacidad antioxidante y el rendimiento cuántico máximo (F_v/F_m) indica que cuando esta especie se encuentra en mejor estado fisiológico, la capacidad antioxidante disminuye (Tabla S.3.2). Este resultado puede explicarse debido a la ausencia de demanda de metabolitos antioxidantes capaces de contrarrestar el desequilibrio causado por el estrés metabólico que la UVR y la baja disponibilidad de N generan, tal como se comentó anteriormente. La capacidad antioxidante encontrada en *G. longissima* puede atribuirse a varias moléculas evaluadas en este estudio, como se ha demostrado podido demostrar por las correlación positiva observadas. Esta capacidad antioxidante sería atribuida al contenido de carotenoides, de lípidos y de compuestos fenólicos fundamentalmente (Stabili et al. 2012). Sin embargo, no se detectaron correlaciones entre la capacidad antioxidante y otras sustancias antioxidantes conocidas como MAAs de acuerdo a la bibliografía (De La Coba et al. 2009). Generalmente, los genes que codifican estos metabolitos antioxidantes (enzimáticos y no enzimáticos) son regulados y adaptados por los requerimientos celulares en respuesta a un estresor (Lesser 2006). Los ROS generadas tras exposición a UVR, podrían ser claves al actuar como importantes componentes inductores para la biosíntesis de moléculas con capacidad antioxidante (Martindale & Holbrook 2002).

5. Conclusiones

En este capítulo se demostró que tanto la disponibilidad de nutrientes como la UVR, pueden causar cambios a nivel ultraestructural en *G. longissima* sin que esto provoque una disminución en el capacidad fotosintética de esta especie, al mismo tiempo que produce una activación considerable del metabolismo secundario. La observación de los cambios morfológicos y ultraestructurales a nivel celular, proporciona una visión integradora de los efectos que estas variables tienen sobre el metabolismo en esta especie. Como evidencian numerosos estudios, las especies del género *Gracilariopsis* se han cultivado en muchas regiones alrededor del mundo (Figuerola et al. 2010), por lo

que estos resultados indican que bajo condiciones de radiación similares a las naturales, *G. longissima* puede producir, además de los ficocoloides clásicos, otros productos que poseen mayor valor agregado y que actualmente demanda la industria biotecnológica para aplicaciones cosméticas, nutraceuticas entre otros muchos sectores.

Capítulo 4

**Efectos interactivos de la radiación solar y los nutrientes
sobre la biofiltración, fotosíntesis, productividad de biomasa
y compuestos bioactivos en *Hydropuntia cornea*
(Rhodophyta)**





Efectos interactivos de la radiación solar y los nutrientes sobre la biofiltración, fotosíntesis, productividad de biomasa y compuestos bioactivos en *Hydropuntia cornea* (Rhodophyta)

4

1. Resumen

En el **Capítulo 4**, se realizó un experimento a mayor escala en *Hydropuntia cornea* crecida durante 35 días en tanques de 90 L de volumen y una densidad algal de 9 g PF L⁻¹. Este experimento se llevó a cabo en las instalaciones acuícolas del Banco Español de Algas (BEA) en el municipio de Telde (Gran Canaria). Se estudió la capacidad biofiltradora de N-NH₄⁺, expresada como eficiencia de biofiltración (NUE) y tasa de incorporación de nitrógeno (NUR). Se determinó la productividad de la biomasa (medida a partir del peso seco de alga y estimada a partir de la tasa de transporte electrónico, ETR), la actividad fotosintética, estimada a partir de la fluorescencia *in vivo* de la clorofila *a*, y la acumulación de compuestos bioactivos de interés biotecnológico. Se estudiaron los efectos interactivos de la radiación y la disponibilidad de nutrientes de nuevo con un diseño experimental bifactorial: PAR (cultivo dentro de un invernadero) *versus* PAB (cultivo fuera del invernadero) y emulando condiciones de efluentes de piscifactoría (altos niveles de NH₄⁺ y PO₄³⁻) *versus* baja disponibilidad de N (control). Se concluye que la especie *H. cornea* es una excelente candidata para el cultivo en condiciones de alto N (aguas ricas en N-NH₄⁺ hasta 150 μmol NH₄⁺) en circuito abierto con una capacidad de biofiltración del 98% (NUE) y una tasa de incorporación de N de hasta 45 mmol NH₄⁺ m⁻² h⁻¹. La productividad de la biomasa alcanzó el nivel más alto en la primera semana de cultivo llegando hasta 80 g PS m⁻² d⁻¹, como consecuencia de una alta incorporación de N-NH₄⁺ y una alta producción fotosintética (ETR_{max}). Este parámetro fotosintético, entre otros, en presencia de UVR y alta disponibilidad de N-NH₄⁺, aumentó en un 63% respecto a las condiciones iniciales. Además, bajo estas condiciones experimentales, *H. cornea* presentó una alta acumulación de compuestos bioactivos de interés tanto nitrogenados: aminoácidos tipo micosporina, como carbonados: ácidos grasos poliinsaturados (Omega-6) y compuestos fenólicos. Por otro lado, la mayor acumulación de proteínas, pigmentos fotosintéticos (clorofila, carotenoides y biliproteínas), ácidos grasos poli-insaturados (Omega-3) y actividad antioxidante se produjo en altos niveles de N-NH₄⁺ pero en ausencia de UVR. Finalmente, el nivel más alto de lípidos y carbohidratos se alcanzó en presencia de UVR, pero con baja disponibilidad de N. El contenido más alto de MAAs totales se alcanzó tras 35 días de cultivo en alta disponibilidad de N-NH₄⁺, produciéndose un incremento de 16 veces (hasta 5 mg MAAs g⁻¹ PS) respecto a los valores

iniciales. La productividad de MAAs aumentó en todos los tratamientos con el tiempo, alcanzándose los valores máximos a los 28 días de cultivo ($237 \text{ mg MAAs m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) en el tratamiento con alto N-NH_4^+ en presencia de UVR (fuera del invernadero), siendo éste el mayor de los valores reportados en la bibliografía sobre productividad de MAAs en algas cultivadas. El contenido de ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs) y de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), aumentaron en un 77 y 93%, respectivamente en todos los tratamientos de promedio respecto a los contenidos iniciales, reduciéndose así el contenido en ácidos grasos saturados en un 55%. Dentro del contenido en PUFAS al final del experimento (35 días), el 72.7% del total correspondió a ácidos grasos del grupo Omega-6, 25.5% del grupo Omega-9 y 1.8% del grupo Omega-3. Esto correspondió, respecto a los valores de la biomasa a los 7 días de cultivo, a una reducción del 87% en Omega-3 y un 19% en Omega-9. En ese tiempo, la proporción Omega-6/Omega-3 de la biomasa algal fue 3.2-3.4 en algas crecidas dentro del invernadero (sin UVR), mientras que fuera del invernadero (con UVR) fue 1.4-7.3. Los valores recomendados de la proporción Omega-6/Omega-3 en una dieta sana en grasas es de 1-2. Así, bajo ciertas condiciones de cultivo, la biomasa de *H. cornea* tiene buenas características como alimento funcional relacionada con los ácidos grasos aunque el contenido en lípidos totales no sea tan alto como el de microalgas. Una gran parte de los compuestos de *H. cornea* están fotorregulados por UVR mostrando efectos interactivos con el contenido en N. Las estrategias fotobiológicas junto con la biofiltración de N-NH_4^+ (como simulación de efluentes de peces) y la acumulación selectiva de compuestos bioactivos, muestra que los cultivos de *H. cornea*, en tanques, son un excelente sistema donde puede ser aplicado el concepto de biorrefinería dentro de la Economía azul, esto es, una aproximación biotecnología y la prestación de servicios ambientales debido a la depuración de aguas con alto nivel de N-NH_4^+ . El cultivo masivo de esta especie supone un reto técnico y comercial para una producción rentable de la biomasa dedicada a la producción de nutracéuticos y cosmeceúticos en primera extracción y bioestimulantes para la agricultura o alimentación animal con el resto de la biomasa y por otro lado, como aplicación ambiental en la depuración de efluentes con alta carga de N-NH_4^+ .

2. Material y métodos

Hydropuntia cornea se cultivó durante 5 semanas (del 1/07/2015 al 8/08/2015) en las instalaciones del Banco Español de Algas (Universidad de Las Palmas de Gran Canaria) en Taliarte (Telde, Gran Canaria, Islas Canarias España: $28^\circ 00' \text{ N}$; $15^\circ 22' \text{ W}$) en condiciones emuladas de aguas residuales de piscifactoría de acuerdo a Gómez Pinchetti et al. (2011). Con el objetivo de estudiar el efecto de la radiación y nutrientes sobre la estimulación de la ruta del N en la biomasa y la producción de sustancias de interés, se establecieron distintas condiciones de crecimiento de las algas en función de dos variables de estudio: radiación solar y disponibilidad de nutrientes. Las condiciones de radiación

vienen determinadas por la localización del cultivo: (1) dentro de un invernadero (Greenhouse), donde penetra la radiación fotosintéticamente activa (PAR, $\lambda=400-700$ nm) pero se filtra gran parte de la UVR ($\lambda = 280-400$ nm) y (2) en el exterior del invernadero bajo radiación solar natural (**Outdoor**) (ver espectro de radiación solar fuera y dentro del invernadero en Material y métodos generales, Figura M.4).

Desde hace más de diez años, el BEA posee un stock de distintas especies de macroalgas, entre ellas *H. cornea*, cultivada bajo invernadero en tanques semicirculares de fibra de vidrio con un volumen de 750 L y 1.8 m² de superficie (S/V = 2.4 m⁻¹) y a una densidad de 13 g L⁻¹. La biomasa de macroalgas utilizada en los experimentos de este proyecto ha sido tomada de este stock y se ha cultivado según el diseño experimental explicado anteriormente y que queda recogido en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Resumen de los tratamientos experimentales empleados.

Nutrientes	Radiación		
	Interior (Invernadero/Solar filtrada)		Exterior (Solar)
	LN (Bajo nutrientes)	LN-G	LN-O
	HN (Alto nutrientes)	HN-G	HN-O

En los cultivos en exterior, las macroalgas reciben el 100% de la radiación solar (compuesta por un 90.3% de PAR, un 9.4% de UVA y un 0.3% de UVB). El invernadero filtra el 100 % de la UVB, y transmite el 2.7 % de la UVA y el 72.3 % de la radiación PAR (Material y métodos generales, Figura M.4).

Para la realización de los experimentos, *H. cornea* fue cultivada en tanques cilíndricos de polietileno de 94 L de volumen y 0.2 m² de superficie (S/V = 1.9 m⁻¹) a una densidad de 9 g PF L⁻¹. En total se dispusieron 12 tanques, seis en exterior y seis en el interior. El flujo continuo de agua de mar enriquecida en nutrientes (N y P) fue de 100-200 μM NH₄Cl y 1-10 μM KHPO₄ (10:1) con tasas de renovación de 64 vol d⁻¹ (tratamientos con alta disponibilidad de nutrientes: HN) y 6.4 vol d⁻¹ (tratamientos con baja disponibilidad de nutrientes: LN). En los tanques, las algas se mantuvieron flotando libres en la columna de agua gracias a la turbulencia que se obtuvo con la aireación suministrada por una bomba de aire de 2.5 KW (ELMO 2BH 1600, Siemens, Alemania) (Figura 4.2). El aire fue suministrado a través de un tubo de polietileno lineal agujereado (1 mm cada 10 cm) que está situado en el fondo del tanque. El flujo de agua fue mantenido en abierto y constante durante todo el experimento. El desagüe está situado en la parte superior del tanque y protegido con una malla evitando así la posible pérdida de biomasa. Los experimentos tuvieron una duración de 5 semanas llevándose a cabo de forma simultánea en exterior y en interior. Los tanques fueron cosechados semanalmente, es decir, a los 7, 14, 21, 28 y 35 días, ajustando de nuevo a la densidad de experimentación fijada (9 g PF L⁻¹). El excedente de biomasa recolectada tras el ajuste de densidad,

fue rápidamente sometida a ultracongelación (-80 °C) y posterior liofilización para su uso en los distintos ensayos y procedimientos analíticos desarrollados.

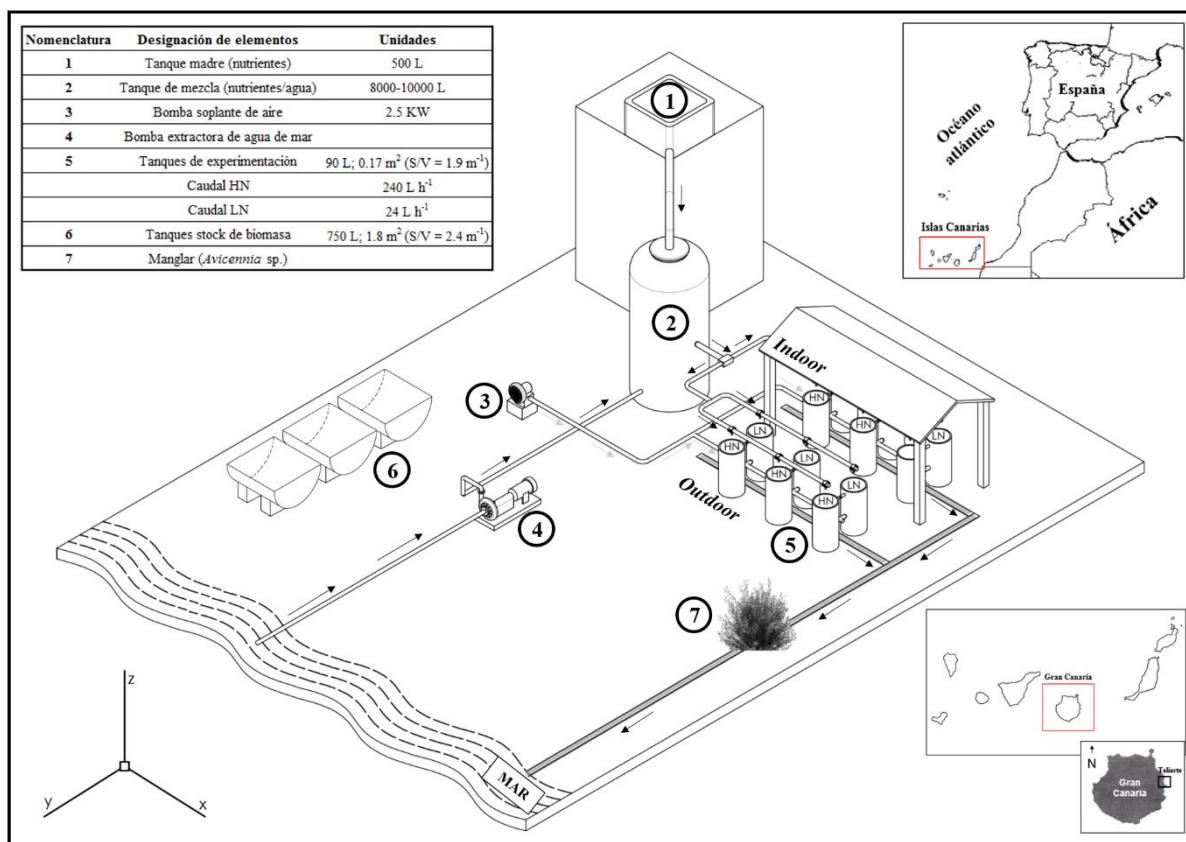


Figura 4.2. Instalación y diseño experimental mediante vista isométrica del sistema abierto en Banco Español de Algas (ULPGC) en Taliarte (Telde, Gran canaria, Islas Canarias, España: 28° 00' N; 15° 22' W). La biomasa de *H. cornea* procedente de stock en condiciones de privación de nutrientes (6) se colocó en cada unidad experimental de (90 L) (5). Desde el tanque madre (1) en el que se añade N y P, se abastece el sistema de recirculación a través del tanque de mezcla (2). El agua de mar se bombea (4) hasta el depósito de mezcla. Mediante la inyección de aire por medio de una bomba soplante (3) se distribuye el aire de forma homogénea por los tanques experimentales consiguiendo así que biomasa algal se mantenga libre en la columna de agua. Las unidades experimentales se mantuvieron en el interior (en invernadero) y en el exterior (en el Sol) bajo condiciones controladas durante 35 días. El fin del sistema termina volviendo al mar, pasando previamente por un manglar del género *Avicennia* el cual termina de biofiltrar el NH₄⁺ (7).

3. Resultados

3.1. Radiación y temperatura

La irradiancia diaria integrada de PAR, expresada en KJ m^{-2} , a lo largo del tiempo experimental (35 días desde el 1 de julio al 6 de agosto de 2015) fue aproximadamente 1.4 veces mayor al aire libre que en el interior. La irradiancia diaria integrada de UVR fue 29.2 veces superior en el exterior que en el interior (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Dosis de radiación PAR y UVA (KJ m^{-2}) en el interior (bajo invernadero) y en el exterior (bajo el Sol) a lo largo del experimento.

Dosis semanal (KJ m^{-2})		Interior		Exterior	
Fecha	Semana	PAR	UVA	PAR	UVA
01/07 al 08/07/2015	1	35345	57.1	48805	2371.6
08/07 al 15/07/2015	2	46446	106.3	62303	3200.2
15/07 al 22/07/2015	3	44287	100.7	62389	2575.9
22/07 al 29/07/2015	4	41068	94.7	61461	2801.8
29/07 al 06/08/2015	5	40657	93.9	55533	2270.5
Total		207805	452.6	290493	13220

A pesar de la nubosidad durante ciertos periodos del día característica de esta zona geográfica influenciada por los vientos alisios, la dosis semanal no presentó diferencias ni en PAR ni en UVA. La intensidad de la radiación registrada diariamente y a lo largo del experimento, estuvo comprendida entre $1900\text{-}2800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 4.3A). La irradiancia máxima de UVA en el exterior, estuvo comprendida entre $25\text{-}80 \text{W m}^{-2}$, mientras que en el interior fue de $0.4\text{-}1.6 \text{W m}^{-2}$ (Figura 4.3B)

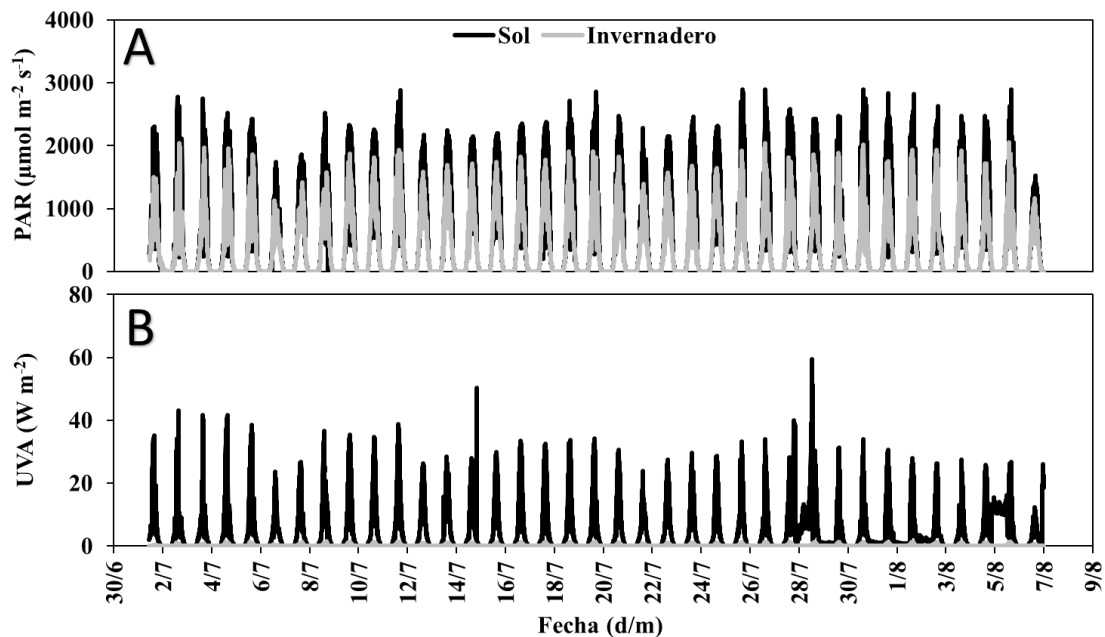


Figura 4.3. Monitorización de la irradiancia PAR ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (A) y UVA (W m^{-2}) (B) a lo largo del tiempo en el interior (invernadero) y en el exterior (Sol).

Con respecto a la temperatura, no hubo diferencias entre los tratamientos en el interior y en el exterior tal como se observa en la Figura 4.4. La circulación abierta y continuada del agua de mar, impide que las temperaturas aumenten por exposición a la radiación, o por el incremento de temperatura en el invernadero, manteniendo constante esta variable a lo largo del tiempo (T) en líneas generales.

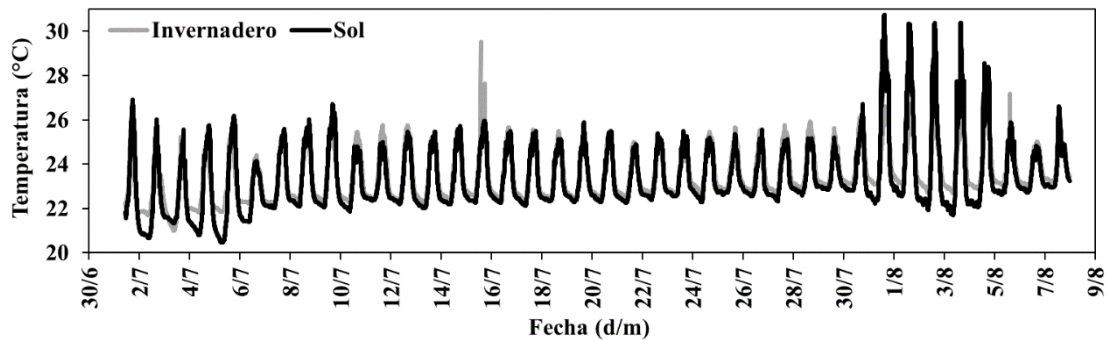


Figura 4.4. Monitorización de la temperatura ($^{\circ}\text{C}$) a lo largo del tiempo en el interior (invernadero) y en el exterior (Sol).

La temperatura estuvo comprendida en ambos lugares entre 20°C en períodos nocturno y 31°C en periodo diurno. La temperatura media fue de $23 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ para ambos lugares (interior y exterior) siendo la temperatura media del periodo nocturno de 21.6°C y la del periodo diurno de 26.9°C (Tabla 4.3). La última semana de experimentación (del 1/8 al 5/8/2016), se registró un incremento de la temperatura, siendo en este periodo experimental, donde se registraron las temperaturas más altas (hasta 30.7°C)

Tabla 4.3. Temperatura promedio, mínima y máxima registrada en el agua de los cultivo a lo largo del periodo experimental.

Semana	Interior		Exterior	
	T $^{\circ}\text{C}$	Min/Max	T $^{\circ}\text{C}$	Min/Max
1	22.8 ± 1.1	21 / 26.9	22.6 ± 1.6	20.5 / 26.9
2	23.4 ± 1.1	22.3 / 25.8	23.3 ± 1.2	21.9 / 26.7
3	23.4 ± 1	22.3 / 27.7	23.3 ± 1.1	22.1 / 26
4	23.6 ± 0.9	22.6 / 25.9	23.4 ± 0.9	22.3 / 25.6
5	24 ± 1.1	22.7 / 26.9	24.1 ± 2.2	21.7 / 30.7
Promedio	23.5 ± 0.4	22.2 / 26.6	23.3 ± 0.5	21.7 / 27.2

3.2. Morfología

H. cornea mostró una gran plasticidad morfológica en función de la irradiancia y de la calidad espectral recibida durante su cultivo. Las algas sometidas a radiación solar presentan una morfología muy ramificada, mientras que las que crecieron bajo condiciones de menor de radiación filtrada (invernadero), presentaron talos largos y poco ramificados (Figura 4.5). Además, las algas cultivadas en el exterior, presentaron un color más claro, más brillante y mostraron una mayor rigidez. La coloración de los talos en los tratamientos en baja disponibilidad de nutrientes (LN) fue de color rojizo (en el interior) a pardo-amarillento (en el exterior), relacionado con los niveles más bajos de pigmentos, tanto clorofilas (Chl_a) o como ficobiliproteínas (ver más adelante), respecto a los tratamientos con alta disponibilidad de nutrientes (HN). Además, la UVR produjo una despigmentación intensa en el tratamiento con baja disponibilidad de nutrientes (LN-O) al final del experimento (35 días), mientras que donde hubo nutrientes en condiciones no limitantes (HN-O), la pigmentación se mantuvo normal.

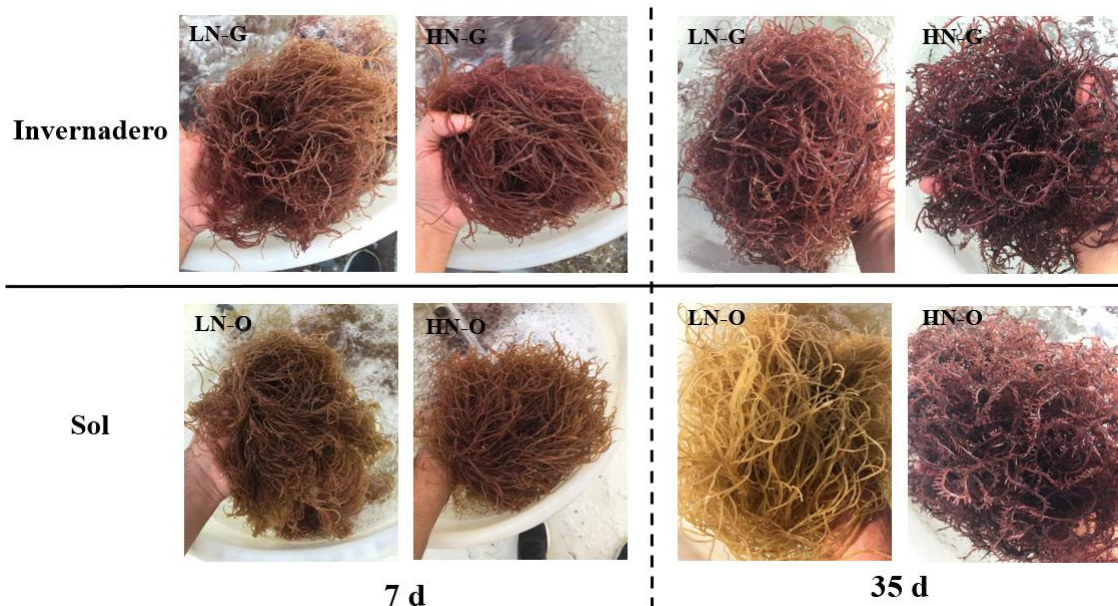


Figura 4.5. Cambios morfológicos y pigmentarios en el alga *H. cornea* a los 7 y a los 35 días para los diferentes tratamientos objeto de estudio.

Los cambios morfológicos anteriormente descritos, se evaluaron mediante medición de la relación superficie/volumen (S/V) en los talos, mediante la relación Peso fresco/Peso seco (PF/PS) la cual indica la cantidad de agua contenida a nivel tisular, y mediante el contenido de cenizas y materia orgánica expresadas en % de PS (Tabla 4.4). Solo se encontraron diferencias significativas, en cuanto a estas variables en la relación S/V ($p < 0.05$), siendo mayor esta relación en el tratamiento con baja disponibilidad de nutrientes cultivada bajo invernadero (LN-G).

Tabla 4.4. Relación superficie/volumen de los talos principales (S/V), relación Peso fresco/Peso seco (PF/PS), contenido de cenizas (% de Peso seco) y materia orgánica (% M.O en peso seco) en *H. cornea*. Cada valor se representa como media \pm S.E. (n = 3). Las letras diferentes en una misma columna implican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

Variable	Invernadero			Sol	
	Inicial	LN-G	HN-G	LN-O	HN-O
S/V	2.7 \pm 0.1	3.2 \pm 0.1 ^c	2.9 \pm 0.1 ^a	2.8 \pm 0.1 ^a	2.5 \pm 0 ^b
PF/PS	8.2 \pm 0.1	8.9 \pm 0.2	9.3 \pm 0.4	8.2 \pm 0.1	9 \pm 0.1
Cenizas (%)	6.8 \pm 0.3	6.1 \pm 0.3	5.5 \pm 0.2	6 \pm 0.3	5.3 \pm 0.3
M.O. (%)	5.4 \pm 0.4	5.3 \pm 0.4	5.2 \pm 0.4	6.2 \pm 0.4	5.7 \pm 0.4

3.3. Biofiltración

La capacidad de biofiltración de *H. cornea*, expresada como NUE (del inglés, *Nitrogen Uptake Efficiency*), disminuyó a lo largo del período de experimentación (Figura 4.6A) significativamente, viéndose afectada por la interacción Tiempo x Nutrientes (T x N) ($p < 0.01$) y no por el efecto de la Luz (L). El NUE fue ligeramente superior (cerca del 100%) en los tratamientos con baja disponibilidad de nutrientes (LN), tanto en el interior como en el exterior, respecto al de las algas cultivadas con altos niveles de nutrientes tanto en el exterior y en el interior. Después de 35 días, los valores de NUE disminuyeron aproximadamente en un 20% para los tratamientos con LN y un 66 % en los tratamientos con HN. Del mismo modo, los valores de NUR (del inglés, *Nitrogen Uptake Rate*) se vieron afectados significativamente por L ($p < 0.05$) y N ($p < 0.01$) de forma independiente, incrementándose 1.7 veces en HN-O, 1.85 en HN-G, 4.42 en LN-O y 4.82 en LN-G, desde el día 7 al 35. Se encontró correlación entre el NUR y el contenido de Chl a ($r = 0.68$; $p < 0.01$), MAAs ($r = 0.60$; $p < 0.01$), proteínas ($r = 0.51$; $p < 0.05$), el contenido de N elemental ($r = 0.78$; $p < 0.01$) y para la relación Omega-3/Omega-6 ($r = 0.68$; $p < 0.01$).

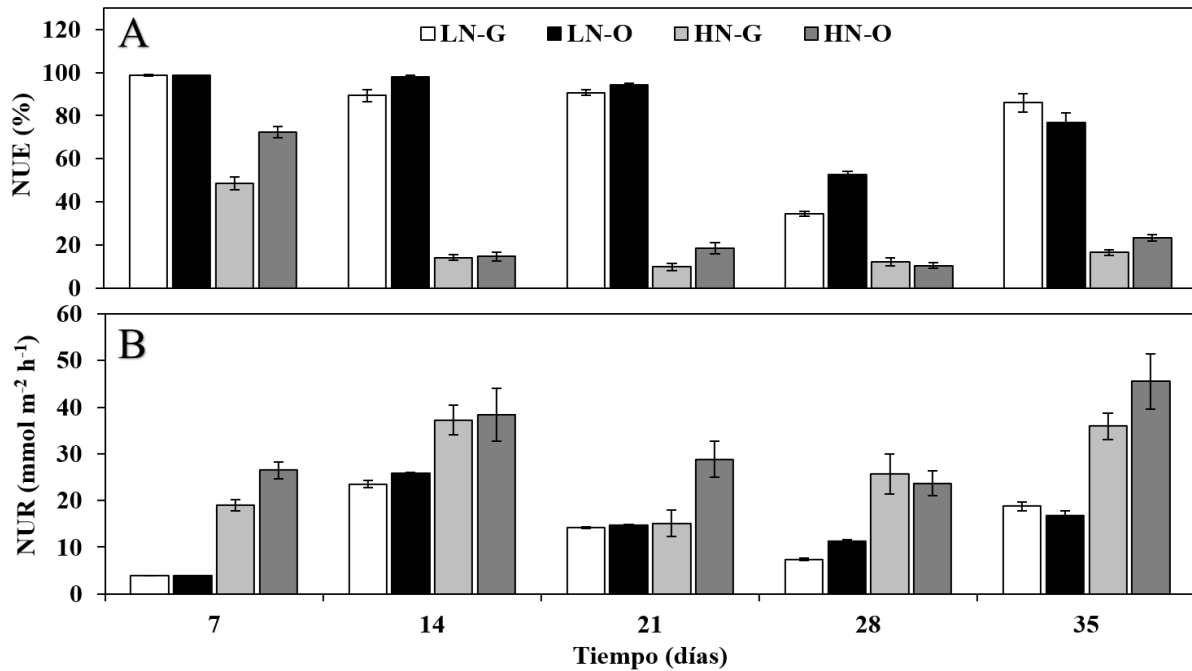


Figura 4.6. Eficiencia de incorporación de nitrógeno (NUE %) (A) y tasa de incorporación de nitrógeno NUR (mmol m⁻² h⁻¹) (B) por *H. cornea* a los 7, 14, 21, 28 y a los 35 días para los diferentes tratamientos LN-G, HN-G, LN-O y HN-O objeto de estudio. Cada valor se representa como media \pm S.E. (n = 3).

3.4. Productividad de biomasa (mBP), de carbono y nitrógeno

Al contrario de lo que cabría esperar, no se observaron diferencias significativas en la productividad de la biomasa medida (mBP) ni en el crecimiento de *H. cornea* cultivada en los distintos tratamientos con respecto al tiempo (Figura 4.7). En todos los tratamientos, la productividad promedio disminuyó aproximadamente en un 49% desde la primera hasta la última semana de experimentación (valores de 71.5 g PS m⁻² d⁻¹ a 36.4 g PS m⁻² d⁻¹). El factor T es la variable independiente estudiada que más contribuyó significativamente a la VT en un 66.9% seguido por L (11.2%), la interacción entre ambos factores (5.47%) y la interacción entre todos los factores considerados (6.8%).

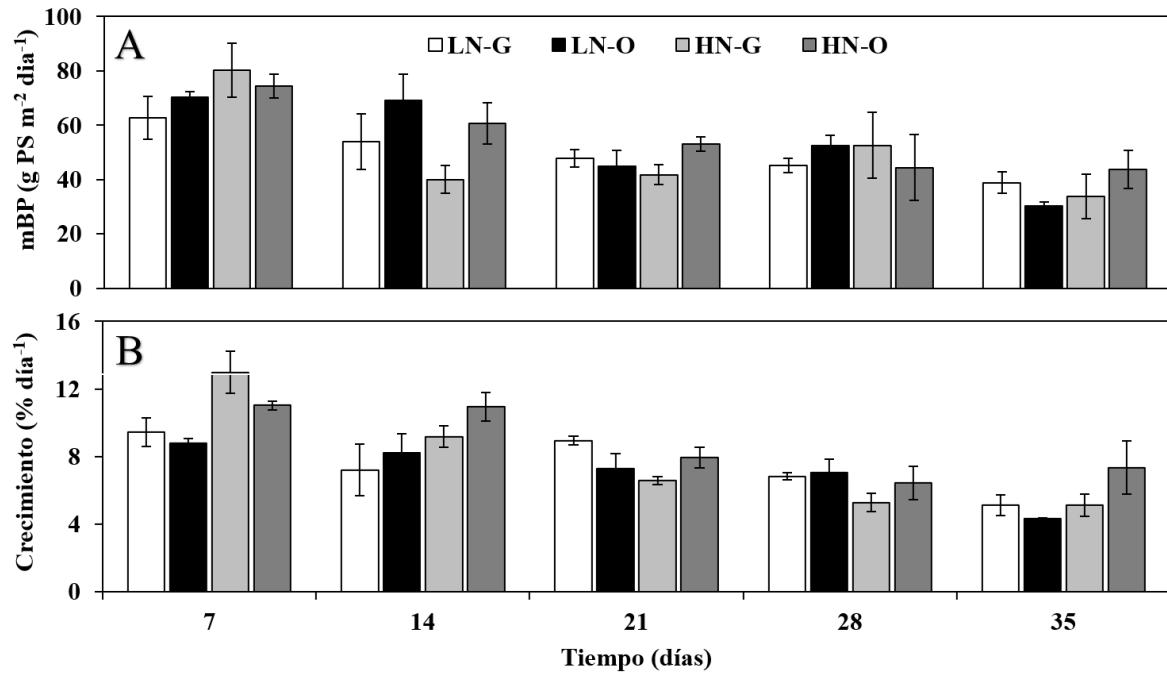


Figura 4.7. Productividad de biomasa (mBP) en g PS m⁻² d⁻¹ (A) y crecimiento de la biomasa (% día⁻¹) (B) por el alga *H. cornea* a los 7, 14, 21, 28 y a los 35 días para los diferentes tratamientos LN-G, HN-G, LN-O y HN-O objeto de estudio. Cada valor se representa como media \pm S.E. (n = 3).

La productividad de C y la productividad de N (productividad de biomasa por contenido elemental de C y N en mg g⁻¹ PS), resultó afectada significativamente ($p < 0.05$) por N, contribuyendo ambas variables en un 94.7 y 97.8% a la VT (Figura 4.8). La productividad de C disminuyó a medida que pasa el tiempo (reducción del 47% en los diferentes tratamientos) mientras que en el caso de la productividad de N, aumentó solamente en los tratamientos con bajo N (LN) (+ 33%). Sin embargo, en los tratamientos con alta disponibilidad de nutrientes (HN), estos valores no cambiaron con respecto al T.

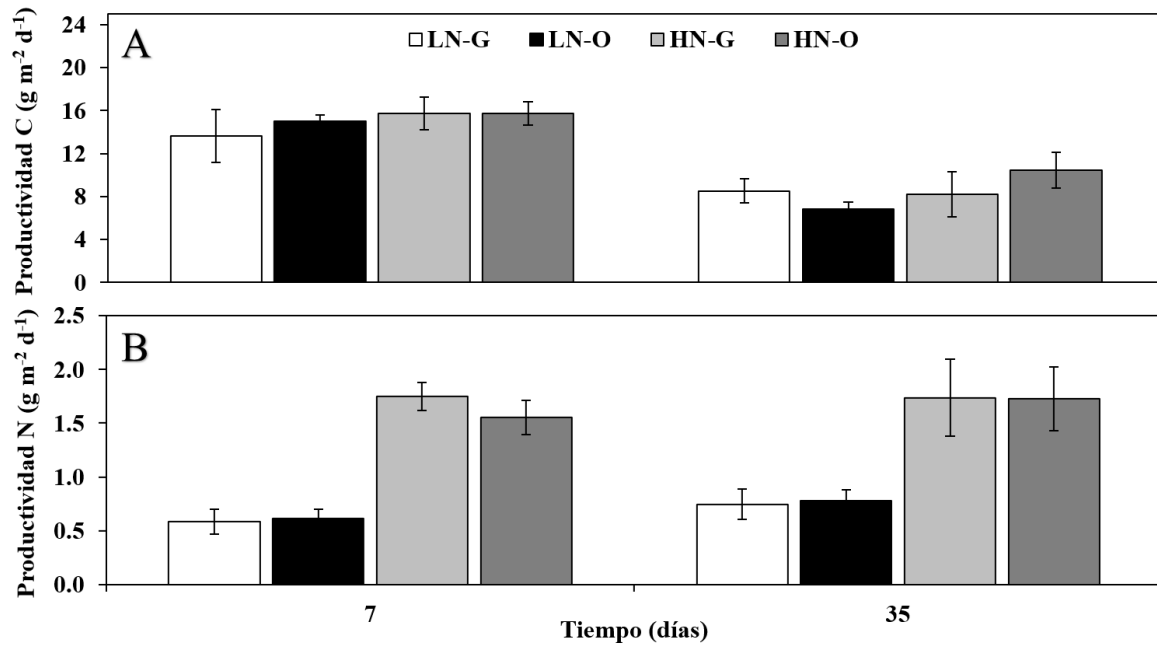


Figura 4.8. Productividad de carbono ($\text{g C m}^{-2} \text{d}^{-1}$) (A) y de nitrógeno ($\text{g N m}^{-2} \text{d}^{-1}$) (B) por el alga *H. cornea* a los 7, 14, 21, 28 y a los 35 días para los diferentes tratamientos LN-G, HN-G, LN-O y HN-O objeto de estudio. Cada valor se representa como media \pm S.E. ($n = 3$).

3.5. Fotosíntesis

La capacidad fotosintética fue evaluada a partir de la Fluorescencia *in vivo* de la clorofila *a* asociada al fotosistema II (PSII). Se determinaron los rendimientos cuánticos máximos (F_v/F_m) y los parámetros fotosintéticos obtenidos a partir de las curvas rápidas de luz (RLC del inglés, *Rapid Light Curve*) en algas expuestas 30 s a diferentes intensidades (12 niveles de intensidad) de radiación artificial (lámpara halógena procedente de un fluorímetro), tasa de transporte electrónico (ETR) determinada *in situ* bajo radiación solar en exposiciones corta (5 min) y la producción fotosintética integrada estimada a partir del ETR *in situ* integrado en ciclos diarios (ETR_i).

3.5.1. Rapid Light Curves (RLC)

A partir de las RLC, se calculó el rendimiento cuántico máximo (F_v/F_m), la eficiencia fotosintética (α_{ETR}) y la relación potencial entre la producción y la disipación ($\text{ETR}_{\text{max}}/\text{NPQ}_{\text{max}}$). El F_v/F_m fue afectado a lo largo del experimento por la interacción del T x L interactivamente ($p < 0.01$) explicando el 14.4% de la VT, y por efecto de N de forma individual explicando el 52.9% de la VT ($p < 0.01$) (Figura 4.9A). Todos los valores se vieron reducidos con respecto a los valores iniciales (0.620 ± 0.025). En el caso de la eficiencia fotosintética (α_{ETR}), esta variable dependiente se vio influenciada por T y N de forma independiente ($p < 0.05$), contribuyendo ambas variables en un 23.5% y 36.8%, respectivamente a la VT, aumentando al final del experimento (a los 28 y 35 días) con respecto a los valores iniciales. El ETR_{max} , sin embargo, incrementó a lo largo del tiempo (Figura 4.9C) mientras

que NPQ_{max} disminuyó (Figura 4.9D). La relación $\text{ETR}_{\text{max}}/\text{NPQ}_{\text{max}}$ fue afectada por N ($p < 0.01$; 88.7 % de la VT). Esta relación aumentó considerablemente en todos los tratamientos y a lo largo de todo el tiempo con respecto a los valores iniciales. Al final del experimento (a los 35 días), los valores para este parámetro habían aumentado en 1.7, 1.6, 3.2 y 2.5 veces en LN-G, LN-O, HN-G y HN-O respectivamente. La relación entre la producción fotosintética y la disipación de energía ($\text{ETR}_{\text{max}}/\text{NPQ}_{\text{max}}$) se correlacionó positivamente con la biofiltración de N expresada como NUR ($r = 0.66$; $p < 0.01$), el contenido en Chl *a* ($r = 0.57$; $p < 0.05$), el contenido interno de C y N como % ($r = 0.70$ y 0.88 respectivamente a valores de $p < 0.01$) y los compuestos nitrogenados producto del metabolismo secundario como MAAs ($r = 0.57$; $p < 0.05$) y proteínas ($r = 0.69$; $p < 0.01$) así como con la capacidad antioxidante total (ABTS) ($r = 0.58$; $p < 0.05$). Además, se encontró correlación negativa con el contenido en ácidos grasos saturados AGs ($r = -0.52$; $p < 0.05$) mientras que existió una correlación positiva con los ácidos grasos mono y poliinsaturados (MUFAs y PUFAs) a niveles de significancia de $r = 0.56$ y $r = 0.52$ ($p < 0.05$), respectivamente.

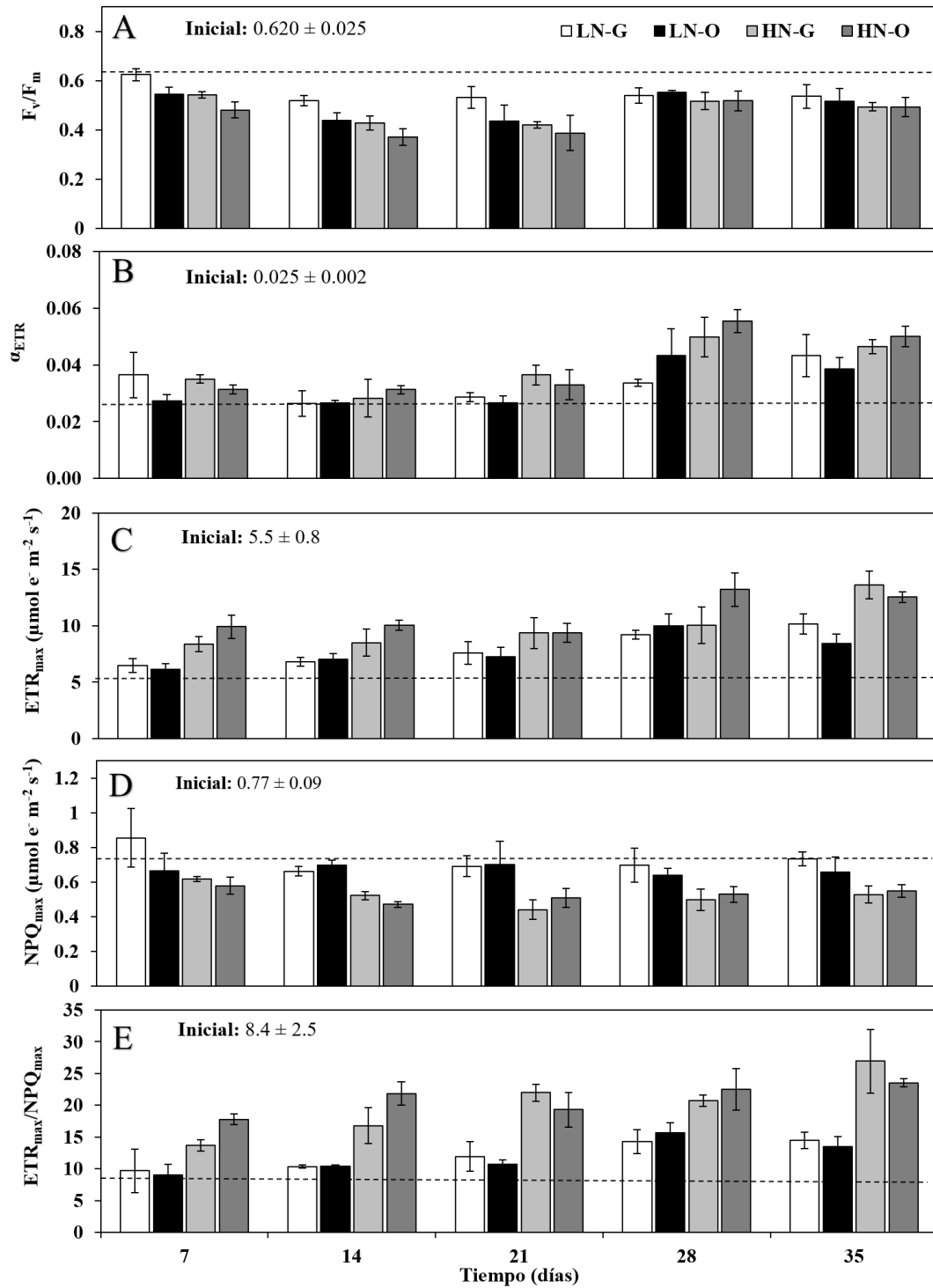


Figura 4.9. Rendimiento cuántico máximo (F_v/F_m) (A), eficiencia fotosintética (α_{ETR}) (B) tasa de transporte electrónico máximo (ETR_{max}) (C), la disipación no fotoquímica (NPQ_{max}) (D) y la relación ETR_{max}/NPQ_{max} (E) en el alga *H. cornea* a los 7, 14, 21, 28 y a los 35 días para los diferentes tratamientos LN-G, HN-G, LN-O y HN-O objeto de estudio. Cada valor se representa como media \pm S.E. (n = 3). Las líneas rayadas (horizontales) indican los valores iniciales obtenidos en el experimento.

3.5.2. Distribución de la energía fotosintética

La división de la energía de excitación absorbida por el fotosistema II (PSII) podría expresarse en términos de rendimientos cuánticos complementarios de conversión de energía fotoquímica $Y(II)$ y pérdidas no fotoquímicas, $Y(NPQ)$ y $Y(NO)$, los cuales sumarían 1 (Klughammer & Schreiber 2008). Para estimar la partición de la energía de excitación absorbida por el PSII, los rendimientos fueron calculados a partir de las RLC en los puntos de intensidad 6 y 12 del fluorímetro (317 y $2962 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) para los días 0 (inicial), 7 y 35, respectivamente (Figura 4.10). Como se muestra en la Figura. 4.10, *H. cornea* tenía un $Y(II)$ inicial bajo (< 0.1) a alta y a baja intensidad de incubación.

En cuanto a las pérdidas no fotoquímicas, inicialmente en ambas intensidades, las pérdidas principal ocurrieron en forma de $Y(NO)$ (0.53 y 0.55 respectivamente) y de $Y(NPQ)$ (0.35 y 0.43 respectivamente). No se encontraron diferencias significativas entre las variables independientes cuando se abordaron los ANOVA factoriales, de manera independiente para cada intensidad. Sin embargo, sí se observaron diferencias significativas cuando se comparan con respecto a la intensidad (E), T, L y N ($E \times T \times L \times N$). Solamente en $Y(II)$ y en $Y(NPQ)$, se observaron diferencias significativas ($p < 0.01$) para la intensidad (E), mientras que en $Y(NO)$ no se apreciaron cambios significativos entre las dos intensidades de incubación. Respecto a las variables independientes estudiadas $T \times L \times N$, en $Y(II)$ hubo interacción para $T \times L$ ($p < 0.05$), obteniendo el valor más alto en el cultivo al interior para el día 35 (0.132). De lo contrario, solo en $Y(NO)$ y $Y(NPQ)$ se observó interacción significativa ($p < 0.05$ y 0.00, respectivamente) para la interacción $T \times L \times N$, siendo el valor más bajo el hallado en LN-G (0.435) para $Y(NO)$, mientras que por el contrario, el valor más alto de $Y(NPQ)$ fue el encontrado también en LN-G para el día 7 (0.479). En incubaciones a $317 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $Y(NO)$ fue el rendimiento predominante mientras que a $2912 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, la contribución de $Y(NPQ)$ aumentó sensiblemente (Figura. 4.10). A los 7 días de cultivo el único tratamiento que presentó distribución de rendimientos similar al de las muestras iniciales, fue el de las algas cultivadas en el invernadero y en baja disponibilidad de nutrientes (LN-G).

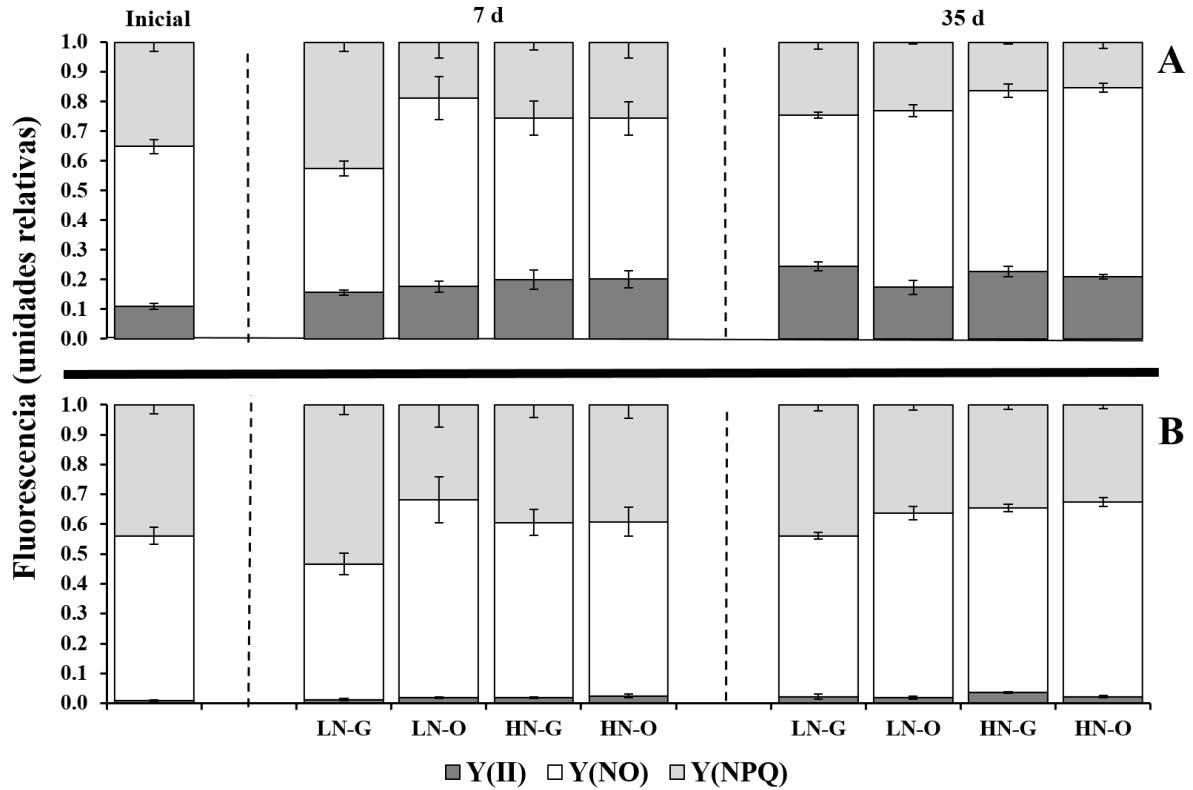


Figura 4.10. Distribución de los rendimientos cuánticos complementarios de *H. cornea*. Los tres rendimientos cuánticos complementarios, el rendimiento cuántico efectivo [Y(II)], el amortiguamiento no fotoquímico regulado [Y(NPQ)] y el amortiguamiento no fotoquímico y no regulado [Y(NO)] para 2 intensidades de radiación distintas proporcionadas por el fluorímetro: 317 y 2912 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (A y B respectivamente).

3.5.3. ETR solar

La Curva de Luz Solar ($\text{ETR}_{\text{solar}}$) fue realizada el día 14/07/2015 (Figura 4.11). Debido a las irradiancias solares máximas alcanzadas ese día, no se alcanzó la saturación en *H. cornea*, por lo que no es posible determinar la irradiancia de saturación ($E_{k_{\text{ETR}}}$) y mucho menos la irradiancia óptima (I_m). Por lo tanto, de esta curva solamente pudo ser obtenida la eficiencia fotosintética (α_{ETR}). Esta variable ($\text{ETR}_{\text{solar}}$) solo fue influenciada por L, a un nivel de significancia menor que 0.05, explicando el 72.9% de la VT. Por lo tanto, los valores de $\text{ETR}_{\text{solar}}$ para los tratamientos bajo radiación solar (LN-O y HN-O) fueron un 30% más altos que los tratamientos bajo invernadero (LN-G y HN-G).

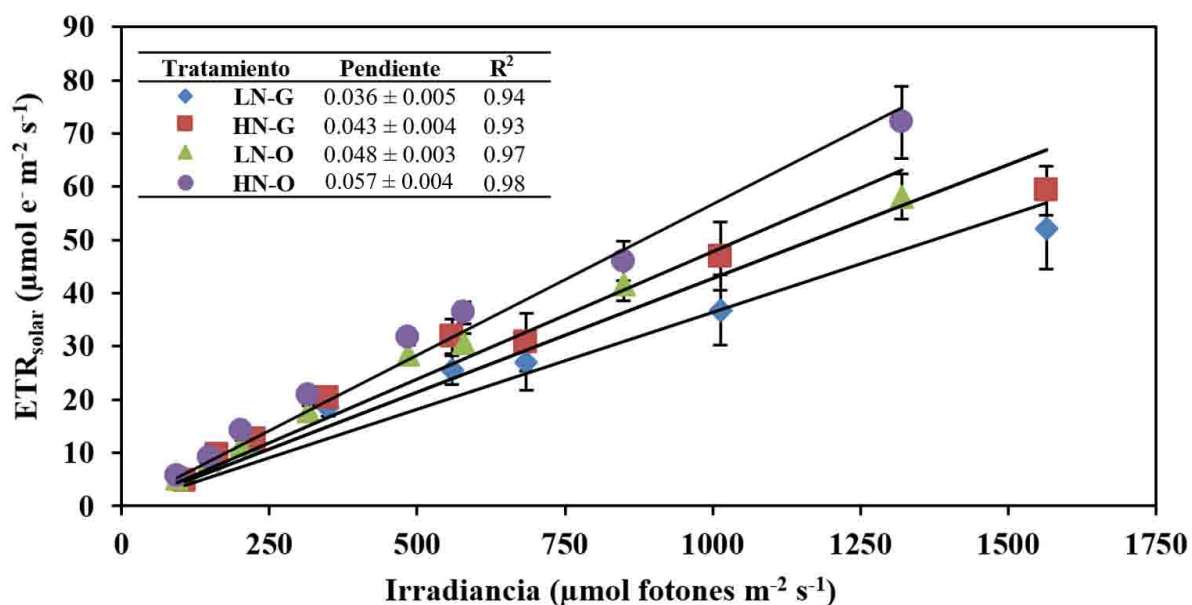


Figura 4.11. Tasa de transporte electrónico en *H. cornea* incubada bajo irradiancia solar (ETR_{solar}) a distintas intensidades de radiación natural ($\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y en los diferentes tratamientos objeto de estudio. Cada valor se representa como media \pm S.E. ($n = 3$).

3.5.4. ETR integrado (ETR_i)

El ETR_i medido cada 5 min, fue calculado a partir del rendimiento efectivo ($Y(II)$) multiplicado por la irradiancia, la absorptancia y el rendimiento efectivo $Y(II)$, durante un ciclo diario para la primera y última semana de experimentación (a los 7 y a los 35 días). El ETR_i bajo radiación solar mostró valores más altos respecto a los datos obtenidos de ETR_{max} a partir de las RLC (5 veces más aproximadamente), pero conservando el mismo patrón, es decir, más producción en los tratamientos con alta disponibilidad de nutrientes (HN), lo que supone un 40% más de producción que con baja disponibilidad de nutrientes. Sin embargo, estos valores se vieron afectados a lo largo del tiempo de ensayo, alcanzando una disminución del 80% en HN y 70% en LN a los 35 días a pesar de estar recibiendo prácticamente la misma intensidad de radiación (Figura 4.12).

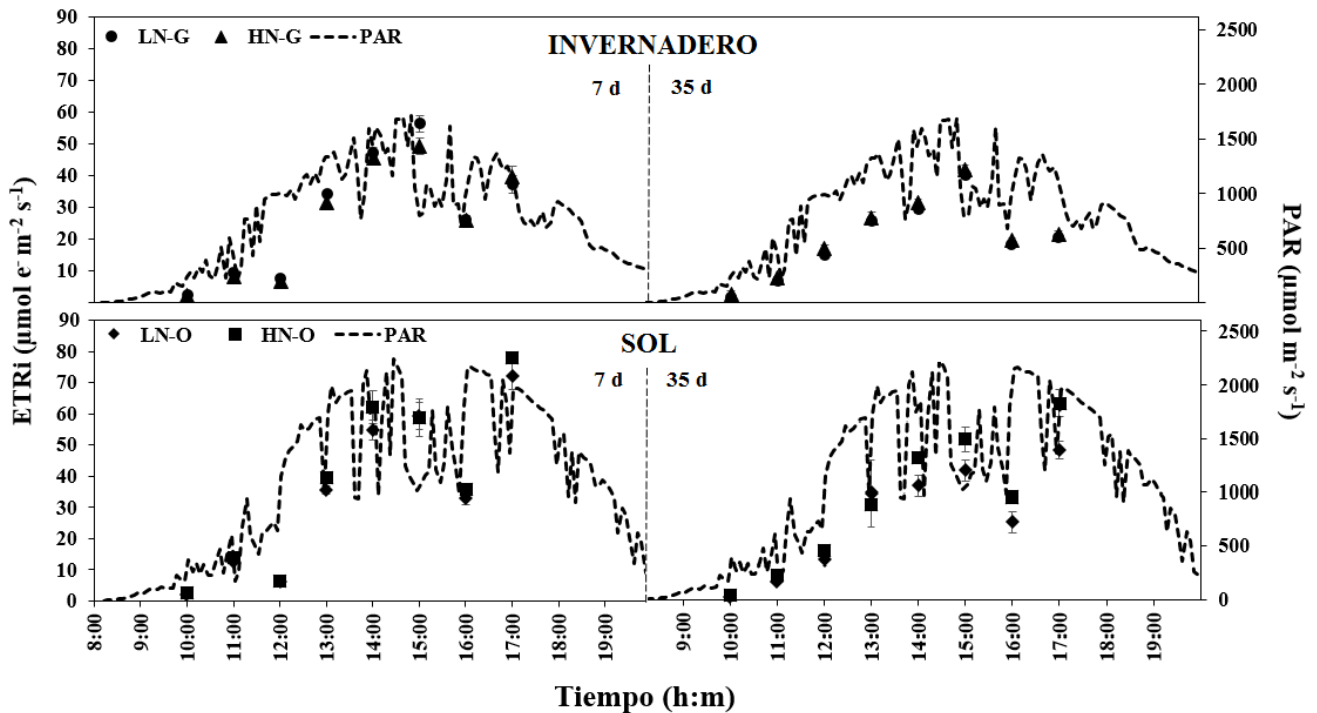


Figura 4.12. Tasa de transporte electrónico integrado en un ciclo solar diario (8:00 a 20:00) en medido a los 7 y 35 días en *H. cornea* sometida a los diferentes tratamientos. Cada valor se representa como media \pm S.E. ($n = 3$).

3.5.5. Estimación de la productividad de la biomasa (eBP)

La productividad de la biomasa expresada por unidad de área (eBP), fue estimada a partir del ETR_{max} obtenido de los ciclos diarios en los que se evaluó el Y(II) a lo largo del día para la primera y quinta semana de experimentación. Para obtener la relación más adecuada entre la productividad de la biomasa estimada (eBP) y medida (mBP), la evolución del O_2 y las tasas de asimilación de carbono se calcularon según diferentes valores del requerimiento cuántico (QR), es decir los fotones necesarios por mol de O_2 producido, cuota fotosintético (PQ), relación entre mol de O_2 producido y mol de carbono asimilado (ver más en detalle Material y métodos generales, Ep. 5.5). Se utilizaron los valores teóricos de QR, es decir, $1/8$ mol de fotones de O_2 /mol, respectivamente y un de valor QR de 1.2 de acuerdo a Gil Jerez (2015). Se comparó el eBP y mBP para la semana 1 y 5 (ambas semanas juntas e individualmente), y a su vez, tanto para las 12 unidades de experimentación verdaderas (4 tratamientos \times 3 tanques) como para los 4 tratamientos en su conjunto para determinar una posible correlación lineal mediante correlaciones de Pearson de la forma más desglosada e integradora posible. Se encontró correlación positiva al comparar, de manera conjunta, la semana 1 y 5, tanto por unidades de experimentación (12 tanques \times 2 semanas = 24 puntos de la recta) como por tratamientos (4 tratamientos \times 2 semanas = 8 puntos), obteniéndose una r de Pearson de 0.74 y 0.82 a niveles de significancia de $p < 0.00$ y 0.01, respectivamente (Tabla 4.5). Las pendientes, en ambos casos, fueron de 0.42 y 0.46 siendo los coeficientes de determinación R^2 , 0.55 y 0.68.

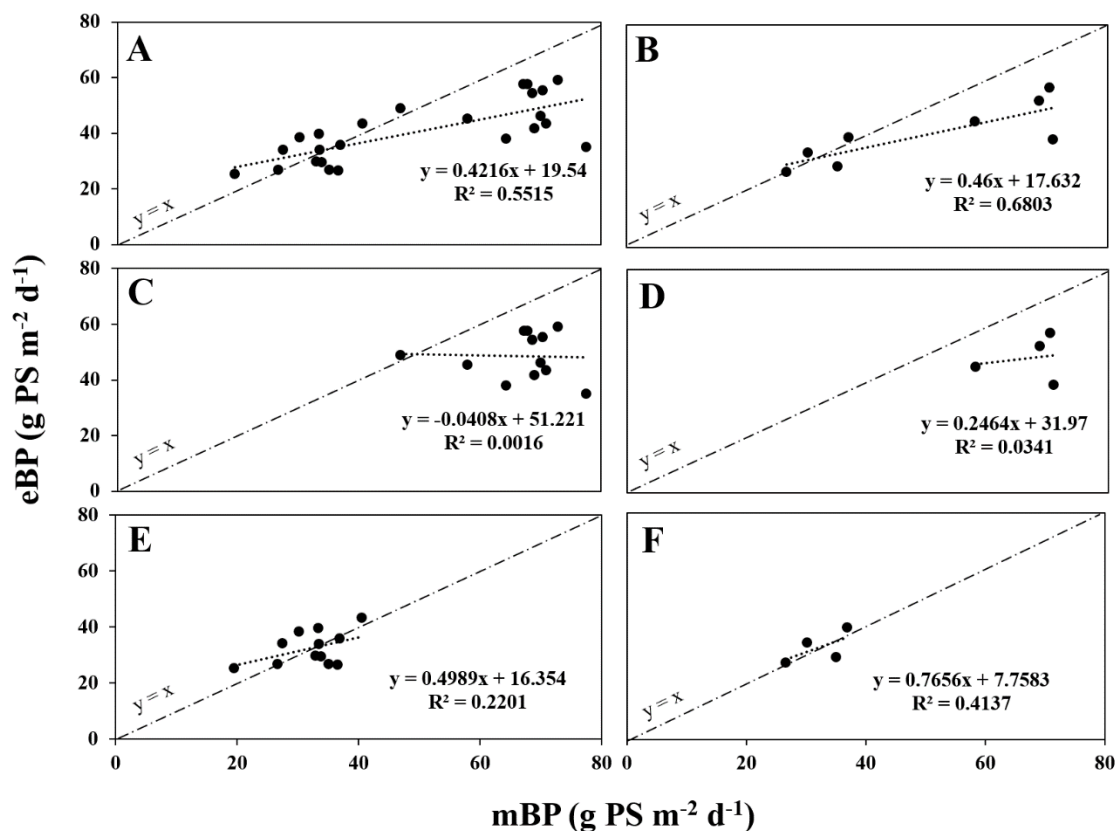


Figura 4.13. Relación entre la productividad de la biomasa estimada (eBP) y medida (mBP) ($g PS m^{-2} d^{-1}$) para *H. cornea*, bajo los tratamientos LN y HN cultivadas en interior y exterior. Se realizaron correlaciones de Pearson para las dos semanas de experimentación (1 y 5) de manera conjunta tanto para los tanques/ unidades experimentales (A) como para los tratamientos (B), así como para la primera semana de experimentación por tanques (C), y por tratamientos (D), y para la quinta semana también por tanques (E) y por tratamientos (F).

Tabla 4.5. Correlaciones de Pearson para la productividad de biomasa estimada (eBP) y la productividad de biomasa real (mBP).

Parámetro estadístico	Figuras					
	A	B	C	D	E	F
m (pendiente)	0.42	0.46	-0.04	0.25	0.50	0.77
b (intercepto)	19.54	17.63	51.22	31.97	16.35	7.76
r de Pearson	0.74	0.82	-0.04	0.18	0.47	0.64
R ²	0.55	0.68	0.00	0.03	0.22	0.41
n	24	8	12	4	12	4
p	0.00	0.01	-	0.82	0.12	0.36

3.6. Composición pigmentaria

El contenido pigmentario sufrió cambios relacionados con los tratamientos. El pigmento fotosintético principal, Chl*a*, se vio afectado por todas las variables independientes y por las

interacciones entre T x L y T x N a un nivel de significancia menor de 0.01. Cabe destacar que la variable independiente que más peso aportó a la VT, fue el N con un 68.6% (Tabla 4.6). El contenido de Chla disminuyó en los tratamientos con baja disponibilidad de nutrientes (LN) respecto a los valores encontrados al comienzo del experimento ($209 \mu\text{g g}^{-1}$ PS), a diferencia de los tratamientos con alta disponibilidad de nutrientes (HN) donde aumentaron a partir de los 14 días y alcanzando valores máximos de $370 \mu\text{g g}^{-1}$ PS en alta HN (tanto en el interior como en el exterior). Respecto a las ficobiliproteínas, tanto la ficocianina (FC) como ficoeritrina (FE) se vieron afectadas por el tiempo ($p < 0.01$) explicando el 58 y 32% de la VT. Sin embargo, solo FE fue afectada, además de por el tiempo, por el N ($p < 0.01$: 36%) y por la interacción del tiempo y la luz (T x L) a un nivel de significancia menor que 0.01 pero explicando sólo el 17.3% de la VT.

Tabla 4.6. Composición pigmentaria. Chla, ($\mu\text{g g}^{-1}$ PS), FC y FE (mg g^{-1} PS) en *H. cornea*. Cada valor se representa como media \pm S.E. (n = 3).

Días	Tratamiento	Chla	FC	FE
Inicial		209 ± 8.4	0.2 ± 0.1	1.3 ± 0.4
7	LN-G	103 ± 6.3	0.1 ± 0.0	0.9 ± 0.3
	LN-O	91.4 ± 17.8	0.5 ± 0.4	1.4 ± 1
	HN-G	189.1 ± 17.9	0.2 ± 0.1	1.5 ± 0.4
	HN-O	115 ± 12.3	0.5 ± 0.3	1.9 ± 0.7
14	LN-G	72.1 ± 12.1	0.1 ± 0.1	0.3 ± 0.1
	LN-O	59.2 ± 3.9	0.9 ± 0.4	2.4 ± 1
	HN-G	186.2 ± 17.9	0.2 ± 0.1	2.1 ± 0.3
	HN-O	188.8 ± 16.2	0.5 ± 0.1	3.9 ± 1
21	LN-G	142.1 ± 21.7	0.9 ± 0.3	3.1 ± 1
	LN-O	157.2 ± 22.5	1.2 ± 0.3	4.8 ± 1
	HN-G	360.9 ± 25	0.9 ± 0.2	5.1 ± 0.5
	HN-O	311.7 ± 26.3	1.1 ± 0.3	5.1 ± 1
28	LN-G	237.7 ± 38.3	0.3 ± 0.0	1.4 ± 0.2
	LN-O	132.5 ± 18.3	1 ± 0.3	4.3 ± 1
	HN-G	443.9 ± 32.9	1 ± 0.3	5.3 ± 0.9
	HN-O	299.6 ± 18.1	0.5 ± 0.1	2.3 ± 0.3
35	LN-G	222.6 ± 25	0.1 ± 0.1	1.2 ± 0.2
	LN-O	173.2 ± 5	0.5 ± 0.1	2.2 ± 0.9
	HN-G	285 ± 17.6	0.4 ± 0.1	3.7 ± 0.4
	HN-O	277.8 ± 37.7	0.4 ± 0.1	2.5 ± 0.5

3.7. Estequiometría C/N

El contenido elemental en Carbono (C %) no varió de forma significativa en relación a los tratamientos, para ninguna de las variables independientes a lo largo del tiempo. Solo en los tratamientos con alta disponibilidad de nutrientes (HN), tanto en el exterior como en el interior, los valores se mantuvieron iguales respecto al inicio del experimento (≈ 22 C %) (Tabla 4.7). Por otro lado, el contenido elemental de nitrógeno (N %) resultó influenciado por la interacción entre T x L x

N ($p < 0.01$; 22% de la VT). Los valores de N fueron 4.7 y 3.5 veces más en HN-G y HN-O respectivamente (a los 35 días) respecto a los valores al comienzo del experimento (día inicial). Por ende, la relación C/N no fue influenciada significativamente por ninguna de sus variables independientes en los tratamientos estudiados. Esta relación disminuyó a los 35 días para todos los tratamientos respecto al valor inicial pasando de valores de 2.1 a valores comprendidos entre 0.5-1.2, lo que supone una caída del 55%. El contenido de C se correlacionó positivamente con la producción ETR_{max} ($r = 0.49$; $p < 0.01$), negativamente con el NPQ_{max} ($r = -0.39$; $p < 0.05$), con la relación ETR_{max}/NPQ_{max} ($r = 0.71$; $p < 0.01$) y con los ácidos grasos Omega-6 y Omega-9 así como con la relación Omega-6/Omega-3 ($r = 0.57, 0.53$ y 0.51 a valores de $p < 0.05$ respectivamente). El contenido de N se correlacionó con los pigmentos Chla ($r = 0.72$; $p < 0.01$) y ficoeritrina (FE) ($r = 0.57$; $p < 0.01$), con los aminoácidos tipo micoposporina Shinorine, Porphyrin-334 y Palythanol ($r = 0.71, 0.74$ y 0.79 respectivamente; $p < 0.01$), el contenido de proteínas ($r = 0.76$; $p < 0.01$) y la capacidad antioxidante ($r = 0.57$; $p < 0.01$)

Tabla 4.7. Contenido elemental de Carbono (C %), Nitrógeno (N%) y relación C/N contenido en la biomasa de *H. cornea*. Cada valor se representa como media \pm S.E. (n = 3). Las letras diferentes en una misma columna implican diferencias significativas entre las especies ($p < 0.05$).

Contenido elemental	Tratamiento	Inicial	Días	
			7	35
C %	LN-G	22.3 \pm 1.2	21.5 \pm 1.4	21.8 \pm 1
	LN-O		21.3 \pm 0.3	22.6 \pm 1
	HN-G		19.8 \pm 0.6	24.2 \pm 0.5
	HN-O		21.2 \pm 0.6	24 \pm 0.4
N %	LN-G	1.1 \pm 0.1	0.9 \pm 0.1 ^b	1.9 \pm 0.3 ^a
	LN-O		0.9 \pm 0.1 ^b	2.6 \pm 0.2 ^a
	HN-G		2.2 \pm 0.1 ^a	5.2 \pm 0.2 ^d
	HN-O		2.1 \pm 0.1 ^a	3.9 \pm 0 ^c
C/N	LN-G	2.1 \pm 0.2	2.4 \pm 0.1	1.2 \pm 0.1
	LN-O		2.6 \pm 0.4	0.9 \pm 0.1
	HN-G		0.9 \pm 0	0.5 \pm 0
	HN-O		1 \pm 0	0.6 \pm 0

3.8. Compuestos Bioactivos

3.8.1. Proteínas, carbohidratos y lípidos

Los tres grandes macrocomponentes fueron evaluados y expresados como porcentaje respecto al PS de *H. cornea*. En el caso de los carbohidratos, se afectaron exclusivamente por L con valores de $p < 0.05$ (66.2% de la VT) y los valores de estos componentes se vieron reducidos respecto a su valor inicial ($\approx 12\%$ para todos los tratamientos) (Figura 4.14A). El contenido de proteínas fue el único macrocomponente influenciado por la interacción T x L x N ($p < 0.05$) aunque solo explicó el 5.9% de

la VT. El 51.4% de la VT fue explicado por la variable N independientemente ($p < 0.01$). El contenido proteico aumentó en todos los tratamientos y los tiempos experimentales con respecto a los valores iniciales (9.6% de proteínas) (Figura 4.14B). El contenido más alto alcanzado se cuantificó al final del experimento (35 días) en el tratamiento con HN en el interior (HN-G) siendo 2.5 veces más que los valores iniciales. Por último, el porcentaje de lípidos totales contenidos en la biomasa de *H. cornea*, no resultó ser influenciado por ninguna variable independiente estudiada. Se alcanzaron valores máximos de hasta el 5% de lípidos. Generalmente los valores más altos de lípidos se cuantificaron en los tratamientos con baja disponibilidad de nutrientes (LN) (Figura 4.14C).

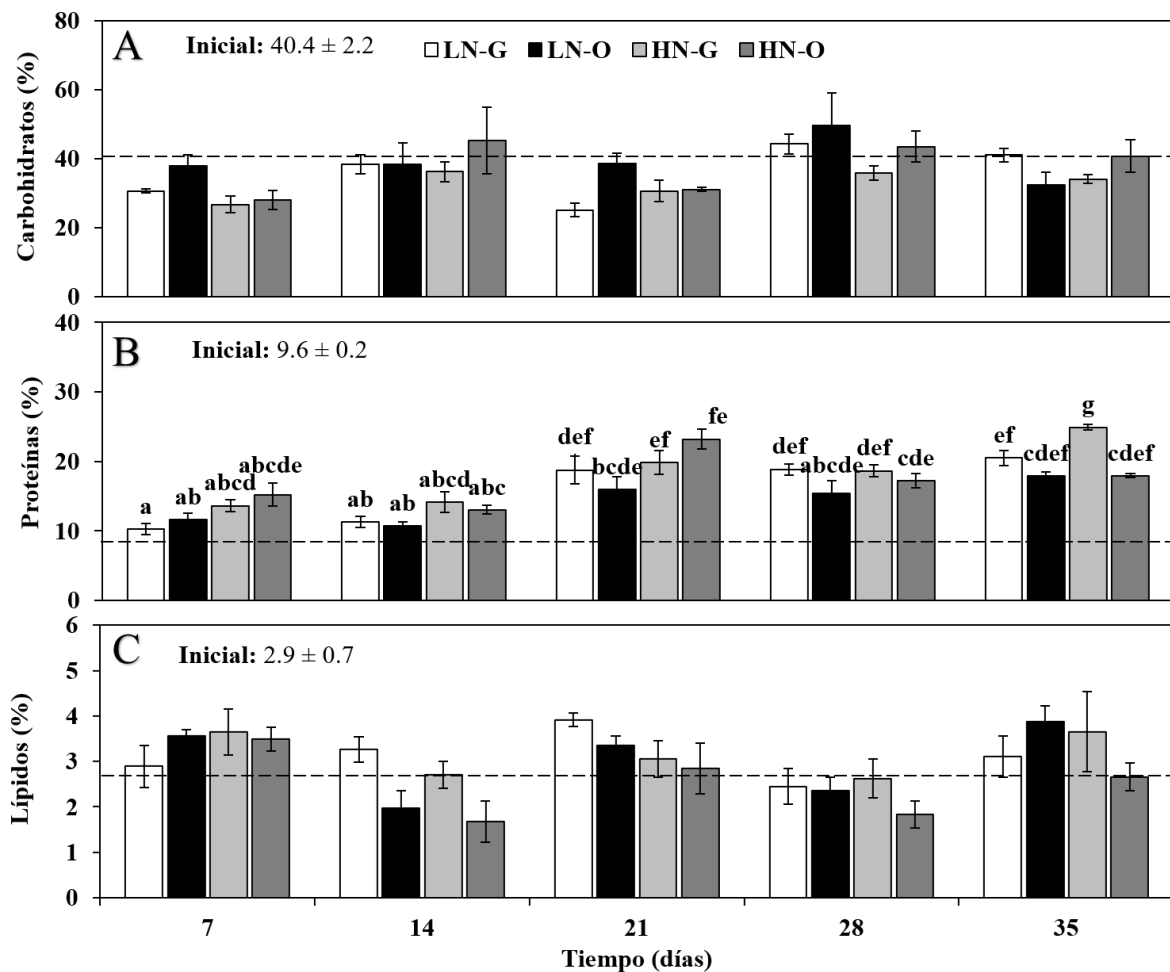


Figura 4.14. Contenido en carbohidratos (A), proteínas (B) y lípidos (C), expresados en % de peso seco para la biomasa de *H. cornea* a los 7, 14, 21, 28 y a los 35 días para los diferentes tratamientos objeto de estudio. Cada valor se representa como media \pm S.E. ($n = 3$). Las letras diferentes en una misma columna implican diferencias significativas entre los diferentes tratamientos LN-G, HN-G, LN-O y HN-O objeto de estudio. ($p < 0.05$). Las líneas rayadas (horizontales) indican los valores iniciales obtenidos en el experimento.

3.8.2. Ácidos Grasos

Los lípidos obtenidos gravimétricamente fueron sometidos a transesterificación con la finalidad de cuantificar el contenido de ácidos grasos presentes en *H. cornea*. La composición de cada uno de los ácidos grasos cuantificados mediante cromatografía de masas, se recoge más detalladamente en “Material suplementario, Tabla S.4.2”. Agrupando estos ácidos grasos en saturados (AGS), monoinsaturados (MUFAs) y poliinsaturados (PUFAs), se observaron efectos significativos en cuanto a las variables independientes estudiadas, para el porcentaje de AGS y de PUFAs. Los AGS se afectaron por el efecto del N ($p < 0.05$) y los PUFAs por el efecto interactivo de T x L ($p < 0.05$). El contenido de ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs) y de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), aumentaron en un 77 y 93% respectivamente en todos los tratamientos (de promedio) respecto a los contenidos iniciales, reduciendo así el contenido en ácidos grasos saturados (AGS) en un 55% (Figura 4.15).

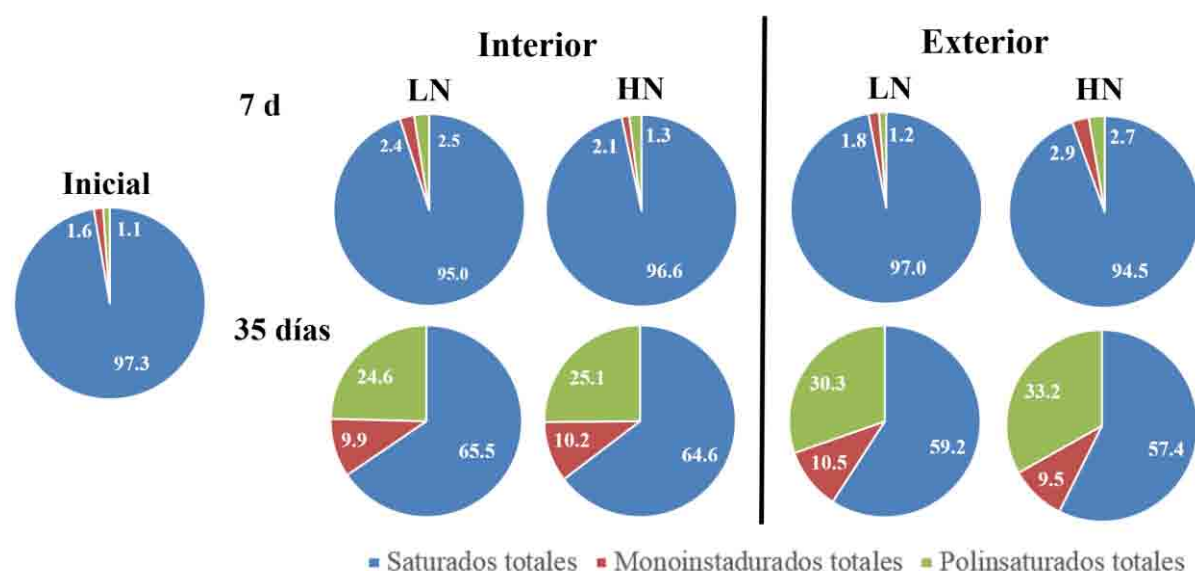


Figura 4.15. Composición porcentual de ácidos grasos totales (saturados, monoinsaturados y poliinsaturados) para la biomasa de *H. cornea* al inicio del experimento, a los 7 y a los 35 días.

Dentro del contenido de ácidos grasos poliinsaturados, se agruparon en los tres grupos de ácidos grasos más relevantes y de mayor importancia en el ámbito nutricional (Omega-3, Omega-6 y Omega-9). Al inicio del experimento (inicial), el 14, 45 y 39% de los ácidos grasos contenidos en la biomasa de *H. cornea*, fueron Omega-3, Omega-6 y Omega-9, respectivamente. Estas proporciones se vieron modificadas por el efecto de los tratamientos. Los ácidos grasos Omega-3, fueron afectados por las variables T x L ($p < 0.05$) mientras que los Omega-6 fueron afectados por T x L ($p < 0.05$), sin embargo, los ácidos grasos Omega-9 no fueron influenciados significativamente por ninguna variable estudiada. El contenido de Omega-3 y Omega-9 se redujo en un 87 y un 19%, respectivamente a los 35 días respecto al cultivo a los 7 días, mientras que los Omega-6 aumentó en un 60% (a los 35 días

respecto a los 7 días). El ratio Omega-6/Omega-3 ($\omega 6/\omega 3$), aumentó considerablemente en 14 y 7 veces para los tratamientos LN y HN en el interior, respectivamente, a los 35 días respecto a los 7 días, mientras que en el exterior, esta proporción aumentó 56 veces para LN y 6 veces para HN.

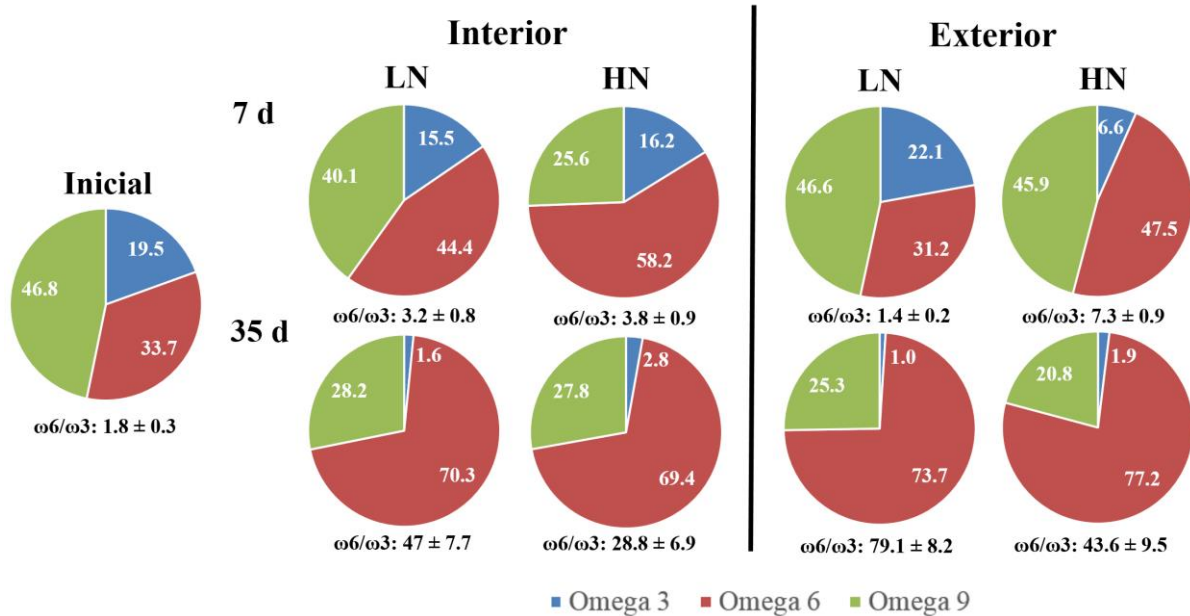


Figura 4.16. Composición porcentual de ácidos grasos poliinsaturados para la biomasa de *H. cornea* al inicio del experimento, a los 7 y a los 35 días.

3.8.3. Aminoácidos tipo micosporina (MAAs)

La composición de aminoácidos tipo micosporina (MAAs) dependió tanto cualitativa, como cuantitativamente del efecto de los tratamientos empleados en el experimento. Todos los MAAs obtenidos, a excepción de uno de ellos (Porphyr-334 en el tiempo inicial) presentaron una exactitud menor de 2 ppm, lo cual indica la verosimilitud de estos metabolitos respecto a los pesos moleculares teóricos obtenidos por otros autores para las mismas moléculas. En *H. cornea*, se identificaron espectrométricamente cinco aminoácidos: Palythine, Palythanol, Porphyr-334, Asterina-330 y Shinorine (Tabla 4.8).

Tabla 4.8. Composición de MAAs mediante Espectrometría de Masas (ESI-MS). Ver cromatogramas en “Material Suplementario. Figura S.4.1”

Tiempo (días)	Tratamiento	MAAs	Fórmula Molecular	λ_{\max} (nm)	Exactitud (ppm)	m/z (calculada)	m/z (observada)
Inicial		Palythine	$C_{10}H_{16}N_2O_5$	320	1.8	245.11320	245.07811
		Porphyra-334	$C_{14}H_{22}N_2O_8$	334	6	347.14489	347.14703
35	LN-I	Palythine	$C_{10}H_{16}N_2O_5$	320	1.2	245.11320	245.11290
		Porphyra-334	$C_{14}H_{22}N_2O_8$	334	2.1	347.14489	347.14417
		Asterina-330	$C_{12}H_{20}N_2O_6$	331	1.6	289.13941	289.19772
		Shinorine	$C_{13}H_{20}N_2O_8$	334	1.4	333.12924	333.12878
	HN-I	Palythine	$C_{10}H_{16}N_2O_5$	320	1.2	245.11320	245.11290
		Porphyra-334	$C_{14}H_{22}N_2O_8$	334	2.3	347.14489	347.14410
		Asterina-330	$C_{12}H_{20}N_2O_6$	331	1.6	289.13941	289.19772
		Palythanol	$C_{13}H_{22}N_2O_6$	332	1.7	303.15506	303.17700
	LN-O	Palythine	$C_{10}H_{16}N_2O_5$	320	1.4	245.11320	245.11285
		Porphyra-334	$C_{14}H_{22}N_2O_8$			No detectado	
		Asterina-330	$C_{12}H_{20}N_2O_6$	331	1.7	289.13941	289.13892
		Palythanol	$C_{13}H_{22}N_2O_6$	332	1.9	303.15506	303.17703
	HN-O	Palythine	$C_{10}H_{16}N_2O_5$	320	1.5	245.1132	245.11284
		Porphyra-334	$C_{14}H_{22}N_2O_8$	334	1.7	347.14489	347.26352
		Asterina-330	$C_{12}H_{20}N_2O_6$	331	1.7	289.13941	289.13892
		Palythanol	$C_{13}H_{22}N_2O_6$	332	1.8	303.15506	303.17697

Respecto al contenido total de MAAs (mg g^{-1} PS) cuantificado mediante HPLC, fue influenciado por T ($p < 0.05$), L ($p < 0.01$) y N ($p < 0.05$) de forma independiente, sin existir interacción entre estas tres variables independientes. De entre todas estas variables, la variable L fue la que mejor explica el porcentaje de la varianza (% PV) en un 58.7%. Así pues, *H. cornea* cultivada en el exterior, mostró valores más altos, alrededor de un 66% más en LN-O respecto a LN-G y 57% en HN-O respecto a HN-G al final del experimento (a los 35 días). En definitiva, los niveles de MAAs totales aumentaron considerablemente en todos los tratamientos respecto a los valores iniciales de 0.3 mg g^{-1} PS (Figura 4.17).

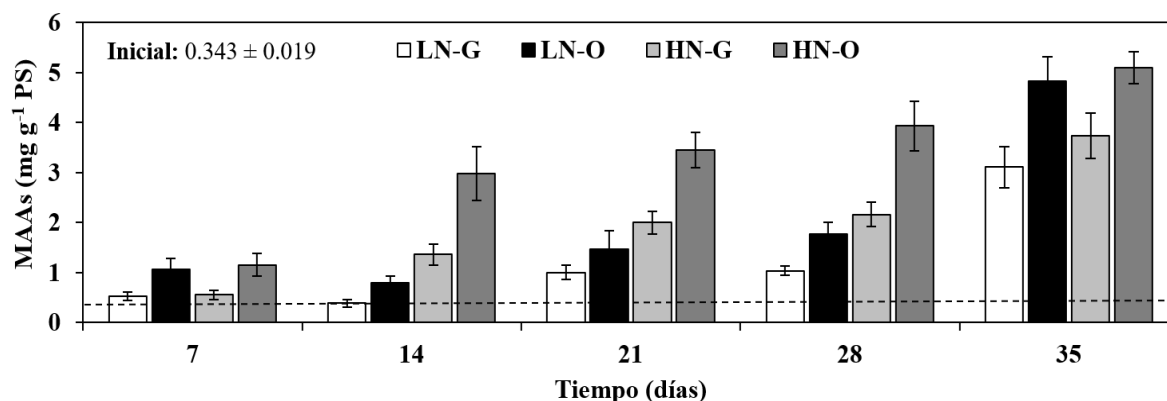


Figura 4.17. Contenido de MAAs totales (mg g^{-1} PS) en *H. cornea* a los 7, 14, 21, 28 y a los 35 días para los diferentes tratamientos LN-G, HN-G, LN-O y HN-O objeto de estudio. Cada valor se representa como media \pm S.E. ($n = 3$). Las líneas rayadas (horizontales) indican los valores iniciales obtenidos en el experimento.

La composición porcentual de los distintos aminoácidos sufrió cambios en cuanto a las proporciones a lo largo del tiempo y en cuanto a los tratamientos empleados (Figura 4.18). Los niveles de Asterina-330, aumentaron en todos los tratamientos respecto al tiempo, a expensas de disminuir los niveles de Shinorine. Los tres MAAs restantes, Palythine, Porphyra-334 y Palythanol, se mantuvieron prácticamente en los mismos niveles a lo largo del tiempo.

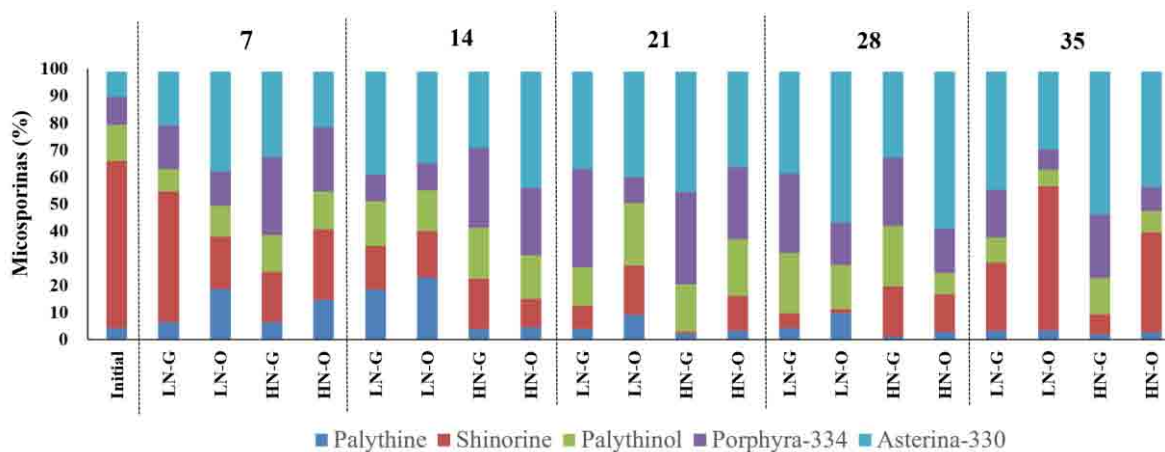


Figura 4.18. Composición porcentual de los MAAs en *H. cornea* al inicio del experimento, y a los días 7, 14, 21, 28 y 35 días para los diferentes tratamientos LN-G, HN-G, LN-O y HN-O objeto de estudio. Cada valor se representa como la media.

La productividad de MAAs expresada en $\text{mg m}^{-2} \text{d}^{-1}$ (producto del contenido de MAAs por la productividad de la biomasa) como era de esperar, se vio influenciada fuertemente por la interacción $T \times L \times N$ ($p < 0.00$) a pesar de que el 76% de la VT se explica a través de L independientemente (Figura 4.19). Para los tratamientos con alta y baja disponibilidad de nutrientes en el exterior (LN y

HN-O), se obtuvo el doble de productividad de MAAs que para los tratamientos con alta y baja disponibilidad de nutrientes en el interior (2 y 1.3 veces más).

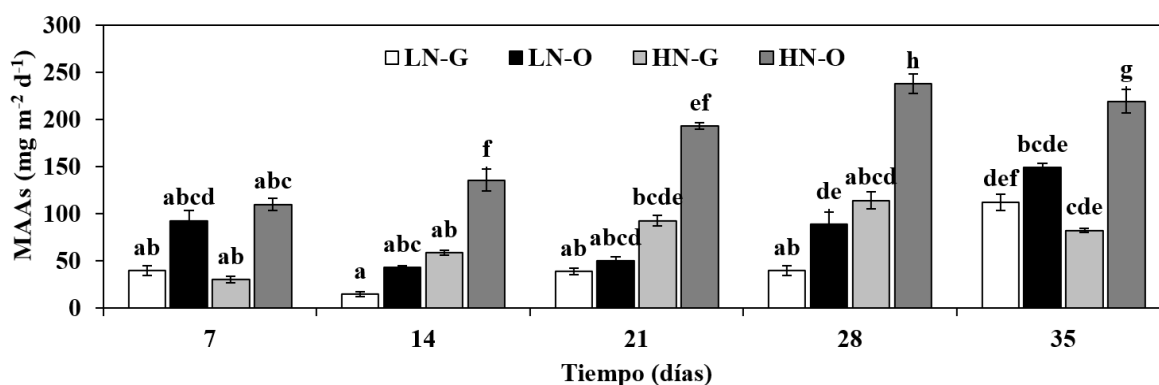


Figura 4.19. Productividad de MAAs ($\text{mg m}^{-2} \text{d}^{-1} \text{PS}$) en *H. cornea* a los 7, 14, 21, 28 y a los 35 días para los diferentes tratamientos LN-G, HN-G, LN-O y HN-O objeto de estudio. Cada valor se representa como media \pm S.E. ($n = 3$). Las letras diferentes en una misma columna implican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

3.8.4. Compuestos fenólicos

El contenido de compuestos fenólicos no se afectó significativamente por ninguna de las variables independientes. Aun así, el 41 y el 23.8% de la VT se explica a través de las variables T y L respectivamente (Figura 4.20). Los valores aumentaron linealmente a lo largo del tiempo respecto a los valores iniciales (desde 13.5 hasta 60 mg g^{-1} de PS).

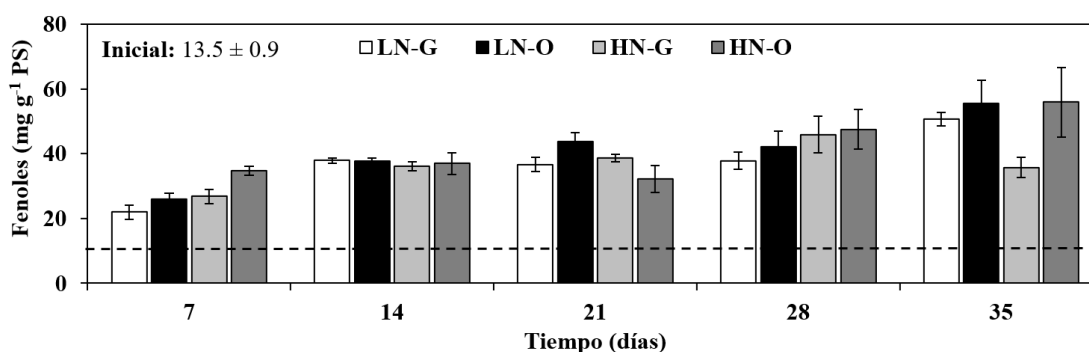


Figura 4.20. Contenido en compuestos fenólicos ($\text{mg fenoles g}^{-1} \text{PS}$) en *H. cornea* a los 7, 14, 21, 28 y a los 35 días para los diferentes tratamientos LN-G, HN-G, LN-O y HN-O objeto de estudio. Cada valor se representa como media \pm S.E. ($n = 3$). Las líneas rayadas (horizontales) indican los valores iniciales obtenidos en el experimento.

3.8.5. Antioxidantes

La capacidad antioxidante en *H. cornea*, se evaluó mediante cuantificación de las principales enzimas: Catalasa (CAT), Superóxido dismutasa (SOD), Peroxidasas totales (POX), Ascorbato peroxidasa (APX), glutatión reductasa (GPX) y Glutatión reductasa (GR) involucradas en la defensa antioxidante, expresados como unidades de enzima por mg de proteínas solubles (U mg^{-1} TSP) y mediante el ensayo para la cuantificación de la actividad antioxidante total (ensayo ABTS).

De las enzimas que se analizaron, solo APX, GR y GPX fueron afectadas por los tratamientos empleados en la interacción T x L x N con valores de significancias de $p < 0.05$ (en APX y GR) y 0.00 en GPX, explicando el 33 el 18.4 y el 81% de la VT respectivamente. La enzima CAT, se afectó por el efecto del N ($p < 0.05$: 93.5% de VT) existiendo más producción de enzima en alta que en baja disponibilidad de nutrientes ($\text{HN} > \text{LN}$). Las enzimas SOD, POX no se afectaron significativamente por ninguna variable (Tabla 4.9). A pesar de esto, la producción de SOD se reduce con respecto al tiempo (alcanzando valores máximos a los 7 días y reduciéndose después), mientras que en POX ocurre justo lo contrario (aumentó respecto al tiempo) aunque no se observaron diferencias significativas.

Tabla 4.9. Actividad enzimáticas de Catalasa (CAT), Superóxido dismutasa (SOD), Peroxidasas totales (POX), Ascorbato peroxidasa (APX), glutatión reductasa (GPX) y Glutatión reductasa (GR). Los resultados se expresan como unidades (U) de actividad enzimática por mg de proteína soluble (TSP). 1 U = μmol sustrato convertido por min^{-1} .

Enzima (U mg^{-1} TSP)	Tratamiento	Inicial	Tiempo (días)	
			7	35
CAT	LN-G	14.2 ± 0.7	12 ± 2.7	14.6 ± 1.7
	LN-O		14.1 ± 2.5	9.2 ± 1.9
	HN-G		9.2 ± 1.4	7.2 ± 1.4
	HN-O		14.5 ± 3.7	14.6 ± 3.1
SOD	LN-G	45.8 ± 10.2	68.7 ± 19.6	55.4 ± 15.5
	LN-O		83.4 ± 7.6	7.9 ± 4.5
	HN-G		70.6 ± 12.4	20.4 ± 5.2
	HN-O		65.5 ± 17.2	9.9 ± 4.8
POX	LN-G	22.4 ± 0.9	41.2 ± 8.3	61.5 ± 4.8
	LN-O		29.9 ± 2.5	48.3 ± 6
	HN-G		37.2 ± 0.8	55.2 ± 5.3
	HN-O		39.4 ± 0.7	44.1 ± 0.4
APX	LN-G	57.1 ± 5.2	113.5 ± 11.9^c	67.8 ± 11.8^{abc}
	LN-O		76.1 ± 9.3^{abc}	62.8 ± 8.3^{abc}
	HN-G		105.7 ± 16.4^{bc}	46.8 ± 11.7^a
	HN-O		57.5 ± 14.9^{ab}	92.9 ± 13.8^{abc}
GR	LN-G	0.54 ± 0.02	0.53 ± 0.08^b	0.28 ± 0.09^{abc}
	LN-O		0.46 ± 0.11^{bc}	0.13 ± 0.04^a
	HN-G		0.55 ± 0.09^b	0.13 ± 0.03^a
	HN-O		0.22 ± 0.04^{ac}	0.14 ± 0.05^a
GPX	LN-G	0.01 ± 0	0.07 ± 0.01^{ab}	0.03 ± 0.01^a
	LN-O		0.03 ± 0.01^a	0.08 ± 0.02^{ab}
	HN-G		0.06 ± 0.01^{ab}	0.06 ± 0.01^{ab}
	HN-O		0.1 ± 0^b	0.04 ± 0.01^a

La capacidad antioxidante total evaluada a partir del ensayo ABTS, solo se afectó por T ($p < 0.05$; 32% VT) y por N ($p < 0.05$). Respecto a los valores iniciales ($10.4 \pm 0.8 \mu\text{mol TEAC}$), todos los tratamientos aumentaron los niveles de antioxidantes hasta 6 veces más. No se observaron patrones en cuanto al tiempo, pero se puede apreciar que en LN y en el exterior (LN-O) los valores de actividad antioxidante fueron más altos que para los demás tratamientos en los días 21 y 35. El contenido de antioxidantes expresado como $\mu\text{mol TEAC g}^{-1}$ PS se correlacionó positivamente con tres aminoácidos tipo micosporina (Shinorine, Porphyrin-334 y Palythanol) con una r de Pearson de 0.60, 0.81 y 0.69 respectivamente a valores de $p < 0.01$, con el contenido de compuestos fenólicos ($r = 0.53$; $p < 0.05$), de peroxidasas POX ($r = 0.68$; $p < 0.01$), el contenido de N interno ($r = 0.57$; $p < 0.05$), de ácidos grasos mono y poliinsaturados (MUFAs y PUFAs) ($r = 0.76$ y 0.67 ; $p < 0.05$), y con la relación $\omega 6/\omega 3$ ($r = 0.57$; $p < 0.05$). También se correlacionó negativamente con el contenido de ácidos grasos saturados (AGS) ($r = -0.68$; $p < 0.01$)

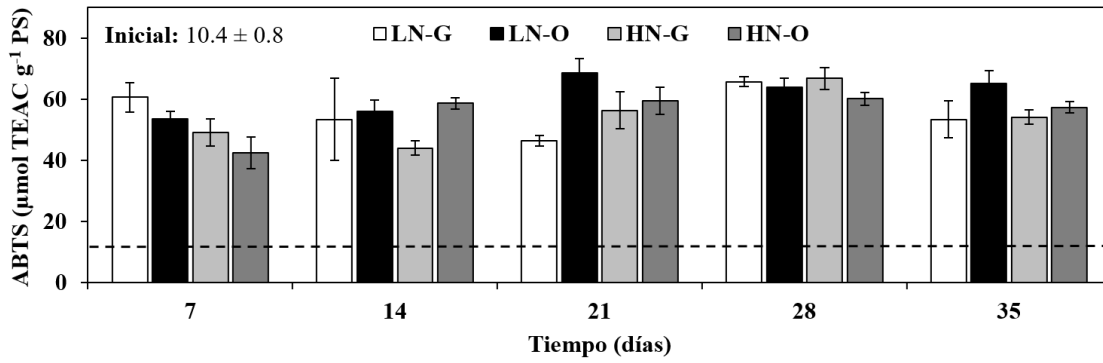


Figura 4.21. Capacidad antioxidante ($\mu\text{mol TEAC g}^{-1}$ PS) en *H. cornea* al inicio del experimento, y a los días 7, 14, 21, 28 y 35 días para los diferentes tratamientos LN-G, HN-G, LN-O y HN-O objeto de estudio. Cada valor se representa como media \pm S.E. ($n = 3$). Las líneas rayadas (horizontales) indican los valores iniciales obtenidos en el experimento.

3.9. Análisis multivariantes de ordenación

3.9.1. Análisis de redundancia (RDA)

El análisis de redundancia (RDA) se realizó en este estudio como complemento para maximizar la extracción de información para la gran cantidad de variables dependientes estudiadas. Este análisis permitió estudiar, en *H. cornea*, la relación entre dos tablas de variables X e Y. Mientras que el método de correlación de Pearson es un método simétrico, el RDA es disímétrico. En el RDA, los componentes extraídos de X están tales que están correlacionados con las variables del Y tanto cuanto sea posible. Entonces, los componentes de Y se extraen para correlacionarlos con los componentes extraídos del X tanto cuanto sea posible.

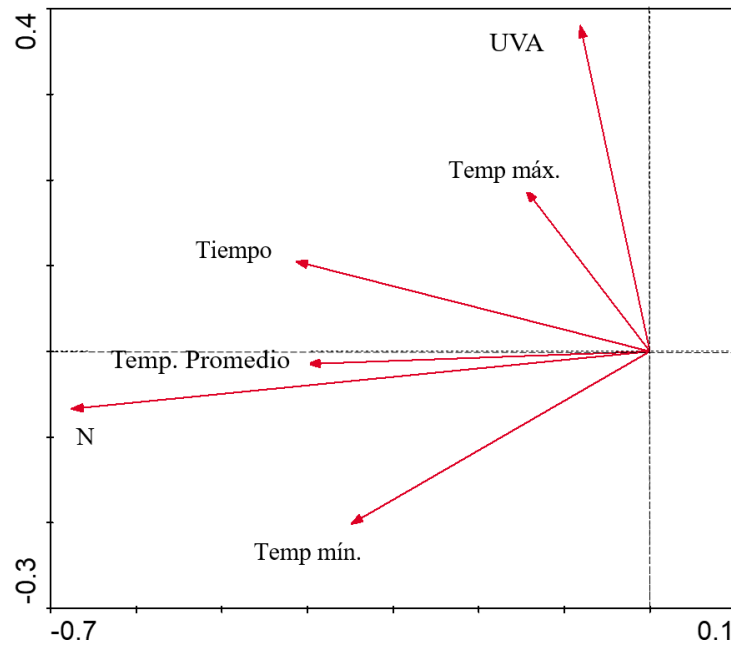


Figura 4.22. Gráfico del análisis RDA para la distribución de las variables independientes evaluadas. Las variables que se representan en la figura son todas significativas ($p < 0.05$).

El análisis RDA se realizó a partir de todos los datos de matriz y eliminado las variables que no están en todos los casos. Este criterio elimina muchas variables, pero es para ver el papel que juega el tiempo en el análisis y si el efecto de las variables ambientales y las relaciones entre variables fisiológicas y estructurales son consistentes en el tiempo.

Los dos primeros ejes explican el 91.9% de la relación entre las variables dependientes y las ambientales. El primer eje explica por si solo el 82.4%. El primer eje viene explicado por el N principalmente y el segundo por UVR (radiación solar). La segunda variable en importancia para el primer eje es la Temperatura media (Temp. promedio) y para el segundo eje las Temperaturas máximas (Temp. máx) El tiempo parece jugar un rol importante, seguramente aumentando la respuesta fisiológica a la disponibilidad de N a medida que este transcurre. Esto se asocia un aumento de las temperaturas mínimas y medias. Solo las temperaturas máximas parecen ir más asociadas a la exposición solar. La radiación PAR no resultó ser significativa.

La Figura 4.23 muestra las variables dependientes evaluadas a lo largo del tiempo. Las variables del cuadrante 4 (flechas hacia la izquierda), relacionadas con el enriquecimiento en N, fueron el contenido en pigmentos fotosintéticos (Chla y FE), la relación PF/PS, el contenido proteico, el contenido del aminoácido tipo micoporfina Porphyrin-334, la capacidad antioxidante total (ABTS) y los parámetros fotosintéticos E_{kNPQ} , además de la relación ETR/NPQ. Por otro lado las variables en el cuadrante 2, son α_{NPQ} , NPQ_{max} y el contenido de cenizas, van asociadas a la UVR (aumentan la Palythine, Asterina-330 y Materia orgánica, y disminuyen PF/PS). Las variables del cuadrante 2, como

la tasa de crecimiento y los lípidos, disminuyen al aumentar N y UVR. Por último, las variables del tercer cuadrante se ven favorecidas por el aumento de UVR y de los nutrientes, como son la productividad de MAAs, los aminoácidos Palythine, Shinorine y Asterina-330.

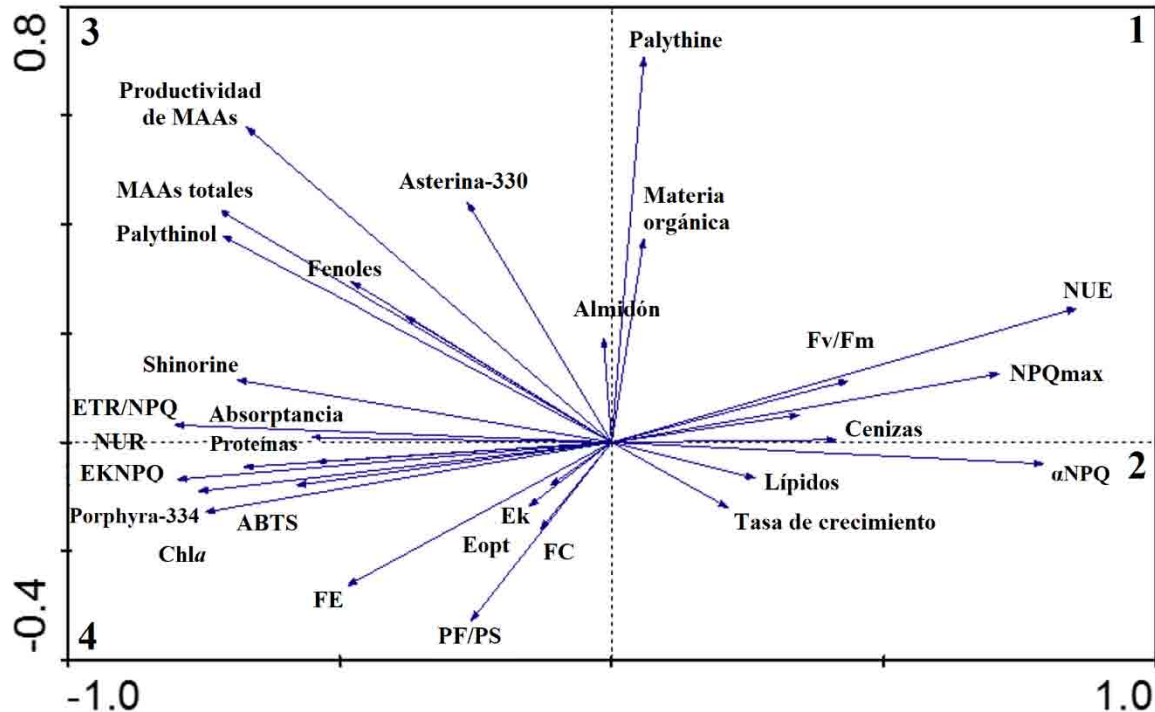


Figura 4.23. Gráfico del análisis RDA para la distribución de las variables dependientes evaluadas.

4. Discusión

4.1. Biofiltración

El uso de macroalgas como organismos biofiltrantes en sistema de biodepuración de aguas residuales de piscifactorías e incluso de aguas residuales urbanas está ampliamente descrita en la literatura, más aun si de la biomasa resultante se obtienen productos con alto valor añadido (Troell et al. 2003; Neori et al. 2004; Figueroa et al. 2012; Rabiei et al. 2016; Macchiavello & Bulboa 2017). En estudios previos similares, sobre cultivo de macroalgas a mesoescala, se han descrito tanto el efecto de aporte de nutrientes, como el de la radiación natural sobre diferentes tipos de cultivos y la productividad de compuestos de interés (Kang et al. 2008; Figueroa et al. 2012; Ukabi et al. 2013; Barceló-Villalobos et al. 2017).

En función del aporte de nutrientes, la cantidad y la calidad espectral, las macroalgas modifican su morfología, volviéndose muy plásticas. En este estudio, la amplia variedad morfológica de *H. cornea*, nos da idea de la adaptación de esta especie al medio en el que se encuentre, siendo la clave

de que ocupen un rango tan amplio en distintos entornos físicos (Gómez & Huovinen 2011; Biskup et al. 2014; Gao et al. 2016). Esta es una de las características más apreciadas a la hora de escoger especies que se adapten a los distintos sistemas de cultivo. Uno de los cambios morfológicos con mayor implicación funcional es el de la relación Superficie/Volumen (S/V) lo que permite una mayor incorporación de nutrientes o captación de radiación en periodos de escasez (aumentando y alargando las ramificaciones) y acortando y engrosando las ramificaciones en periodos de alta irradiancia. A su vez debido a estar libres en la columna de agua van tomando morfologías más esféricas (ballforming) debido al movimiento de turbulencia que provoca la aireación, aumentando la capacidad de incorporación de nutrientes. Este mismo fenómeno, en cuanto a los cambios morfológicos, también se ha observado en otras especies como *Asparagopsis armata* (*Falkenbergia rufolanosa*) cultivada en efluentes de piscifactoría con alto N-NH_4^+ (Figuerola et al. 2008; Mata et al. 2010).

La capacidad biofiltradora de especies de Gracilariales cultivadas en tanques, en sistemas terrestres de acuicultura integrada, ha sido estudiada recientemente por otros autores (Abreu et al. 2011a; Gómez Pinchetti et al. 2011; Andayani et al. 2016; Liu et al. 2016). Los resultados del presente capítulo muestran que *H. cornea* puede actuar como un eficiente organismo biofiltrador de efluentes nitrogenados (N-NH_4^+) con valores de NUE de hasta 99% respecto a flujos de NH_4^+ de 24 L h^{-1} .

Las especies que son morfológicamente más simples y que presentan altas relaciones S/V muestran una tasa de absorción de N-NH_4^+ mayor (Taylor et al. 1998). Los valores de NUR nos dan una idea de la capacidad que tienen las distintas especies de eliminar o incorporar los nutrientes. Es relevante la evolución que siguió esta especie durante el experimento, puesto que, a pesar de seguir disponiendo de la misma cantidad de N entrante, la tasa de incorporación de N fue disminuyendo. Esto puede deberse a la estrategia que siguió esta especie, la cual capta el N en periodos donde no hay disponibilidad para poder así acumularlo en sus tejidos (tras 7 días en privación de N previo inicio del experimento) para posteriormente utilizarlo en situaciones limitantes.

También, hay que tener en cuenta que no sólo la radiación y la disponibilidad de nutrientes son los únicos parámetros que afectan a una biofiltración eficiente, y no todas las especies absorben el N de la misma forma, siendo esta capacidad específica de cada especie (Korbee et al. 2004a; Gómez Pinchetti et al. 2011). La NUR observada en *H. cornea* para este estudio, es superior a la lograda con el cultivo de algunas Ulvaceas, como *Ulva rotundata* ($1.45 \text{ g N m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) (Mata & Santos 2003).

La NUE máxima se alcanza en los cultivos en exterior, en los que también se ha observado una mayor concentración de MAAs respecto a los cultivos que se sitúan en interior. Este resultado sugiere que, a un flujo de NH_4^+ de $150 \mu\text{M h}^{-1}$, el N disponible en el medio procedente de los efluentes, se emplea preferentemente en la síntesis de MAAs, coincidiendo con lo observado por Figuerola et al. (2008) a flujos de NH_4^+ menores a $10 \mu\text{M h}^{-1}$. Todo esto, unido a que la concentración de Chl *a* y

ficobiliproteínas también es mayor en las algas cultivadas en presencia de UVR, puede ser indicativo de que la radiación solar estimula la movilización del N disponible en el medio hacia la síntesis de compuestos nitrogenados con capacidad fotoprotectora (MAAs) y pigmentos (ficobiliproteínas y Chla). Se ha demostrado que la acumulación de MAAs puede inducirse por la UVR o por luz azul de forma directa, no viéndose afectada por la luz roja ni verde (Franklin et al. 2001; Korbee et al. 2005). Esto sugiere la existencia de fotorreceptores específicos asociados a la síntesis de MAAs (Shick & Dunlap 2002). Se ha observado más genéricamente que la luz azul estimula el metabolismo del N mediante la acumulación de Chla y ficobiliproteínas (Figueroa & Niell 1991) y la luz roja estimula el metabolismo del C y el crecimiento (Figueroa et al. 1995). Además, la acumulación de compuestos nitrogenados bajo luz azul, se encuentra relacionada con la estimulación de la incorporación de N (Figueroa 1996; Korbee et al. 2005). Por ello, no se descarta la existencia de una estimulación indirecta de la UVR sobre la acumulación de MAAs a través de fotorreceptores asociados a mecanismos de incorporación de N en *H. cornea*, como han demostrado otros autores en cianobacterias y algas rojas empleando iluminación policromática y monocromática (Sinha et al. 2001; Kräbs et al. 2002, 2004; Zhang et al. 2007). Es interesante destacar que solo resultó afectada la ficobiliproteína mas externa del ficobilisoma (ficoeritrina, FE), la cual puede ser desacoplada de este complejo supramolecular formando agregados en el citoplasma sirviendo así de reservorio de N (Talarico & Maranzana 2000).

4.2. Fotosíntesis, productividad de biomasa y composición pigmentaria

En este estudio, *H. cornea* fue afectada por la disponibilidad de nutrientes, disminuyendo los valores de rendimiento cuántico máximo (F_v/F_m) a lo largo del tiempo, respecto a los valores iniciales, debido al N fundamentalmente. Este resultado puede interpretarse debido a que más más de la mitad del N total se destina a procesos bioquímicos relacionados con el aparato fotosintético (Makino & Osmond 1991). De lo contrario, se observó un mayor aumento de la relación ETR_{max}/NPQ_{max} en HN que en LN (tanto en el interior como en el exterior) ocasionado por el incremento en N. Sin embargo, el ETR_{max}/NPQ_{max} se mantuvo en valores prácticamente constantes (en los tratamientos con bajo N) respecto a los del tiempo inicial. Concentraciones bajas de N que no satisfarían los requerimientos en N de *H. cornea* pudiendo favorecer la reducción del tamaño de la antena fotosintética. Esta disminución del tamaño de PSII debido a esta causa ya ha sido reportada en plantas vasculares terrestres (Ballottari et al. 2007), pero se han realizado pocos estudios en macroalgas (Figueroa et al. 2014). Las disminuciones tanto de ETR_{max}/NPQ_{max} y de F_v/F_m en algas cultivadas en bajo N también podría ser indicativo de fotoinhibición (Barufi et al. 2011) siendo la susceptibilidad a la fotoinhibición, mayor en las algas cultivadas con bajo N que en aquellos cultivadas con alta disponibilidad de N (Grassi et al. 2001).

La eficiencia fotosintética (α_{ETR}) se mantuvo constante en todos los tratamientos respecto a los valores iniciales, hasta los 28 días donde hubo un incremento en este parámetro para los todos los tratamientos influenciados por el T y N. Los tratamientos con alto N mostraron una mayor eficiencia fotosintética. De lo contrario, una disminución en el suministro de N, tal como se observa a partir de los valores del contenido interno de N, puede iniciar una cascada de eventos, incluyendo la regulación para la recolección de luz y la fijación de CO₂, que redunde en una menor eficiencia fotosintética en algas (Geider et al. 1998).

La alta contribución del Y(NPQ) a altas irradiancias, indica la existencia, en *H. cornea*, de un mecanismo regulado a intensidades más altas lo cual indica una alta capacidad fotoprotectora para disipar el excedente de energía luminosa en las primeras etapas del estrés nutricional (Klughammer & Schreiber 2008) tal y como se observó en LN-G donde además, se observó que la contribución del Y(NO) es más alta. En intensidad 6 del fluorímetro Diving-PAM (317 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), con el tiempo aumenta la contribución de Y(NO) lo cual que no ocurre en la intensidad 12 (2962 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Así pues, los cultivos con N en condiciones limitantes (LN) han perdido una parte significativa de su actividad fotosintética (ETR_{max}) al final del experimento, lo que causó una reducción sustancial en la productividad de biomasa. Los tratamientos con limitación de N mostraron menor Y (NPQ) y mayor Y (NO) que los tratamientos con alto N, lo que probablemente esté relacionado con menor actividad fotoprotectora y mayor disipación de energía térmica (Klughammer & Schreiber 2008).

La tasa de transporte de electrones (ETR) está directamente relacionada con las tasas de evolución de O₂ (Beer et al. 2000; Franklin & Badger 2001; Longstaff et al. 2002). Por consiguiente, el ETR ha sido ampliamente utilizado como un buen indicador de la productividad primaria. Así pues, respecto a la estimación de la productividad de la biomasa, en cuanto a los cultivos de macroalgas, no se dispone de información suficiente en la literatura sobre la comparación del ETR y la productividad de la biomasa (Runcie & Riddle 2012). Sin embargo, existe algo más de información en microalgas (Jerez et al. 2016). Obata et al. (2009) mostraron una relación lineal entre ETR_r (relativo, sin considerar la absorptancia ni la absorción del PSII) y Chla en *Chlorella vulgaris* cultivadas bajo luz artificial en condiciones de laboratorio. Torzillo et al. (1998) presentaron una buena correlación entre la suma diaria de ETR_r y la productividad de la biomasa de *Spirulina platensis* cultivada en fotobiorreactores al aire libre, ya que ambos parámetros mostraron el mismo porcentaje de variación. El presente estudio fue un paso adelante, mostrando los valores de la productividad de la biomasa estimados a partir de ETR_{max} que es alcanzada en un ciclo diario. Esta productividad estimada de la biomasa (eBP) mostró una relación lineal con la productividad de la biomasa medida (mBP). En este caso, la eBP fue cercana a los valores medidos, siendo sólo 58 y 54% menores (pendientes = 0.42 y 0.46), para las semanas 1 y 5 (días 7 y 35), expresado por tanques y por tratamientos. Esta subestimación hallada, concuerda con los resultados encontrados por Jerez et al. (2016) en *Chlorella vulgaris* cultivada a baja densidad (<1.5 g

PF L⁻¹), donde se observó una pendiente de 0.42. Por el contrario, un aumento en la linealidad y una relación más cercana a la relación 1:1 ha sido demostrada en cultivos con alta densidad de biomasa, lo que indicaría que los procesos fotosintéticos se mantuvieron estrechamente vinculados a la productividad de biomasa (Jerez et al. 2016).

Por lo tanto, los resultados encontrados para *H. cornea* indicarían el acoplamiento existente entre la fotosíntesis y la productividad de la biomasa medida (mBP) (Falkowski & Raven 2013) aunque matizando que se pueden dar varias interpretaciones para explicar la baja correlación entre eBP y mBP. La más aceptada podría ser explicada a través de la disminución significativa de la actividad fotosintética en respuesta a las altas irradiancias pudiendo conllevar posibles daños en el PSII, lo que conduciría a procesos alternativos en el ciclo de electrones. Estos podrían inducir un desacoplamiento entre el PSII y la evolución neta del O₂ (Kromkamp et al. 2009; Ralph et al. 2010, Jerez et al. 2016). Diferentes combinaciones de suposiciones han sido utilizadas por otros autores, principalmente enfocándose en comunidades naturales, para mostrar la correlación entre la evolución del O₂ o las mediciones de la fijación de C, con las estimaciones correspondientes a partir del ETR. Sin embargo, a día de hoy no hay ningún método único para hacer esta comparación y que sea universalmente aplicable o aceptado (Suggett et al. 2010).

Para resumir, relaciones no lineales se caracterizarían por fenómenos de procesos no fotosintéticos que consumen electrones. Para las macroalgas, el ciclo de electrones alrededor de PSII y el amortiguamiento no fotoquímico en centros PSII, son procesos que probablemente contribuyen a la no linealidad observada aunque puedan existir otros procesos minoritarios que no contribuyan a mantener la linealidad (Gilbert et al. 2000; Franklin & Badger 2001; Longstaff et al. 2002; Suggett et al. 2010). Figueroa et al. (2003) demostraron en dos especies de *Ulva* (Chlorophyta) y en el alga roja *Porphyra leucosticta* que la relación entre fotosíntesis bruta (FB) y el ETR, no muestran una relación lineal, sino tangencial. La relación es lineal debajo de la irradiancia de saturación de la producción de O₂ y la relación ETR/FB es 5 (5 electrones del PSII por mol de O₂ producido) mientras que a irradiancias mayores de la E_k_{ETR} de producción de O₂, la proporción ETR/FB-O₂ fue de 8-15, es decir que la producción de O₂ se mantiene estacionaria mientras que el flujo de electrones incrementa. Este fenómeno se relacionó con procesos de consumo de O₂ a irradiancias altas como la relación de Mehler asociado al PSI. Figueroa et al. (2003) propusieron no un modelo lineal de la relación entre ETR y FB sino un modelo tangencial que abarcara irradiancias por encima o por debajo de la irradiancia de saturación de la fotosíntesis (E_k). Flaming & Kromkamp (1998) también encuentra relaciones entre rendimientos de fluorescencia y de producción de O₂ mayores del valor teórico de 5, en microalgas cultivadas en el laboratorio y fue atribuida a reacciones de consumo de O₂ asociado al PSI (relación de Mehler) en fotofosforilación cíclica y actividades cíclicas también en el PSII. Lawrenz et al. (2013) analizaron las relaciones entre ETR y FB determinada por el método de fijación de C¹⁴ en microalgas

de distintas aguas en un amplio número de campañas oceanográficas. Encontraron que la relación ETR/incorporación de CO₂ en las microalgas marinas de distintas aguas, fue mayoritariamente mucho mayores del valor teórico de 5. La mayor parte de las muestras alcanzan valores en el intervalo de 8 a 30. Este valor mayor que el teórico, se asoció a aguas con limitación de N y los valores más próximos a 5 a aguas con niveles de N más altos. Así pues, la asimilación de N y la proporción ETR/FB parecen estar vinculadas.

La concentración de Chl_a disminuyó en los tratamientos de baja disponibilidad de N. La disminución de este pigmento en especies deficientes en N se acompaña generalmente de una disminución de la concentración de la enzima RuBisCo (Seemann et al. 1987). Por lo tanto, una parte de la disminución de la capacidad fotosintética que se produce con la deficiencia de N (encontrada en los tratamientos con LN) podría ser atribuida a la disminución de la cantidad de enzimas del ciclo de Calvin (Sugiharto et al. 1990). Además, considerando las algas crecidas en condiciones de N limitantes, la disipación térmica puede representar el 64-73% de la luz absorbida por la antena del PSII, mientras que en algas sin esta limitación, el rango estaría comprendido de entre 36-59% (Verhoeven et al. 1997). Así pues, en *H. cornea*, la fracción de luz absorbida en el PSII y utilizada en procesos fotobioquímicos disminuye con la deficiencia de N. Teniendo en cuenta que la fracción de luz absorbida por PSII en las algas rojas es baja (0.15) (Grzymski et al. 1997; Figueroa et al. 2003), este valor podría disminuir con la deficiencia de N pudiéndose observar una disminución de la relación ETR_{max}/NPQ_{max} para *H. cornea* en este estudio.

Al igual que ocurre con los MAAs, como se verá más adelante, en condiciones de alta disponibilidad de N, la concentración de Chl_a y ficobiliproteínas fue incrementándose a lo largo del periodo de cultivo, respecto a los tratamientos con bajo N. Esto es debido fundamentalmente a que la alta disponibilidad de N incrementa la concentración en pigmentos fotosintéticos, proteínas solubles y N interno. Además, las ficobiliproteínas ejercen un rol adicional al servir como reservorio de N ante situaciones de estrés metabólico (Korbee et al. 2004a). De esta forma, cuando los organismos tienen limitación de este elemento, se produce la degradación de los ficobilisomas para emplearlo en otras prioridades celulares (Aráoz & Häder 1997). De lo contrario, bajos niveles de N en el cultivo reducen el contenido pigmentario total (Chl_a y ficobiliproteínas) así como el contenido en proteínas solubles, tal como la enzima RuBisCo, en diferentes algas (Beardall et al. 1991; Wulff et al. 2000). El contenido de ficobiliproteínas disminuye tanto en las cianobacterias (Boussiba & Richmond 1980; Müller et al. 1997) como en las algas rojas (Talarico & Maranzana 2000), y en contraste, el alto suministro de nutrientes produce un rápido aumento de las ficobiliproteínas, alcanzando un 30-40% en cianobacterias (De Marsac & Houmard 1993). La proteólisis de las ficobiliproteínas, puede representar el 17.3% de las proteínas solubles de las algas rojas (Hernández et al. 1993), proporcionando a las células los aminoácidos y microelementos necesarios para su supervivencia en condiciones limitantes. Cuando los

organismos son privados de un nutriente esencial, los ficobilisomas comienzan a ser degradados específicamente (Aráoz & Häder 1997). Se ha sugerido que las ficobiliproteínas tienen dos funciones principales, servir de pigmento accesorio al cloroplasto para aumentar la capacidad de absorción espectral y como proteínas de almacenamiento (Algarra & Rüdiger 1993, De Marsac & Houmard 1993). En concreto, las ficobiliproteínas del orden Gracilariales, representan una gran reserva de N y muchos estudios han demostrado que sus concentraciones están correlacionadas positivamente con la disponibilidad de N en este orden (Lapointe 1981; Lapointe & Duke 1984; Vergara et al. 1995; Jones et al. 1996). Además, cabe mencionar que Vergara et al. (1995) demostraron que la síntesis de ficobiliproteínas se estimula preferentemente con respecto a la síntesis de otras proteínas, en respuesta pulsos de N en *Gracilariopsis lemaneiformis* (Zubia et al. 2014).

El rendimiento máximo de N (productividad de N), en *H. cornea* fue de $2 \text{ g N m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ para los tratamientos con HN. Estas cantidades son superiores a otras especies estudiadas: *Ulva rigida* ($1.4 \text{ g N m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) (Mata & Santos 2003), *Ulva lactuca* ($0.5 \text{ g N m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) (Figueroa et al. 2009), *Gracilaria conferta* ($0.8 \text{ g N m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) (Figueroa et al. 2010) pero inferiores a otras especies que también suscitan interés como biofiltros como *Asparagopsis armata* ($2.7\text{-}5.9 \text{ g N m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) (Schuenhoff et al. 2006). Gómez-Pinchetti et al. (2002), reportaron valores mucho más altos, para *H. cornea*, crecida en efluentes de estanques de peces en tanques de 1000 L y 0.8 m de diámetro: $10.1 \text{ g N m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ (algas cultivadas al aire libre) y $6.1 \text{ g N m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ (algas cultivadas de interior). El menor rendimiento de N en *H. cornea* encontrado aquí puede ser explicado por la menor densidad de biomasa estudiada (9 g PF L^{-1}) y por el tamaño empleado de los tanques (90 L) en comparación con el estudio anterior (1000 L). De acuerdo con la revisión de C/N entre algas marinas por Duarte (1992), *H. cornea* presenta uno de los contenidos más altos de N interno entre las algas estudiadas pero es menor que el mostrado por *G. conferta* en alto N-NH_4^+ de efluentes de peces (Figueroa et al. 2010).

4.3. Carbohidratos, lípidos y proteínas

Los compuestos provenientes del metabolismo primario como los carbohidratos, en *H. cornea*, se incrementaron en condiciones de baja disponibilidad de N tal como se ha observado en otras macroalgas de los géneros *Gracilaria* y *Gelidium* (D'Elia & DeBoer 1978; Bird et al. 1982; Macler & West 1987). Estas observaciones coinciden con el patrón inicialmente descrito por Neish et al. (1977) según el cual el contenido en carragenatos de *Chondrus crispus* aumentaba cuando era cultivada en aguas pobres en N. Este patrón, comúnmente llamado *efecto Neish*, establece una relación entre la disponibilidad de nutrientes, la calidad lumínica y la estimulación del metabolismo del C o del N: bajo limitación de N y radiación roja, el metabolismo es dirigido hacia la acumulación de polisacáridos, mientras que en condiciones ricas en N y bajo radiación enriquecida en luz azul, se acumula el N en compuestos de reserva fácilmente movilizables como ficobiliproteínas (Figueroa & Niell 1991) o MAAs (Korbee et al. 2004b; Nathalie Korbee et al. 2005; Huovinen et al. 2006).

Los factores abióticos como la luz y los nutrientes afectan la cantidad de lípidos totales y por ende, a la composición de ácidos grasos (AG) en algas (Thompson 1996). La composición de AG en respuesta a la alteración de la intensidad lumínica y calidad espectral ha sido mucho más estudiada en microalgas que en macroalgas, en relación con la producción de lípidos para piensos animales (dieta larvaria en acuicultura) y alimentación humana (Ulmann et al. 2017). En cuanto a las macroalgas, el efecto de la luz sobre la composición de AG ha sido estudiado sólo para unas pocas especies y estos estudios resultaron contradictorios (Floreto & Teshima 1998). En *Gracilaria* sp., el contenido de AG insaturados incrementó con el aumento de la intensidad lumínica (Levy et al. 1992), mientras que en *Gracilaria verrucosa*, disminuyó en altas irradiancias (Floreto et al. 1993; Imbs et al. 2001). Así pues, la composición lipídica de las macroalgas puede mostrar cambios durante la exposición a distintas intensidades lumínicas y composiciones espectrales, debido a que existe una estrecha relación entre los lípidos y los subcomplejos anclados al fotosistema dentro de las membranas de los tilacoides (Thompson 1996; Klyachko-Gurvich et al. 1999). Por lo tanto, la radiación solar aumentó las concentraciones totales de lípidos, de ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs) y ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) de igual forma en baja o alta disponibilidad de N mientras que los ácidos grasos saturados (AGS) disminuyeron. Es sabido que la limitación de N, aumenta la concentración de lípidos en algas (Sharma et al. 2012), sin embargo, en *H. cornea* solo se observó incremento significativo debido a la exposición a la radiación solar. Esto indica que la exposición a UVR solar puede promover la formación de insaturaciones en esta especie. Normalmente se piensa que la exposición a UVR resulta en una reducción de los PUFAs. Esto podría explicarse en base a la peroxidación de lípidos o cambios en el metabolismo de los lípidos por exposición a PAB (Hessen et al. 1997), mientras que el aumento en las concentraciones de AG, bajo alta exposición de UVR, indica una degradación oxidativa de los lípidos totales para formar ácidos grasos libres (Skerratt et al. 1998). También hay otras explicaciones para la reducción de los PUFAs que enlazan con una serie de mecanismos celulares. Durante la biosíntesis de ácidos grasos, el proceso de alargamiento de la cadena e insaturación requiere una gran cantidad de ATP comparado con el requerido para la producción de AGS y de MUFAs (Thompson et al. 1990). Por lo tanto, parece probable que un suministro limitado de ATP puede ser la causa de la disminución de las concentraciones de todos los ácidos grasos insaturados de cadena larga. Debido a que UVR restringe (pero no inhibe completamente) la producción de ATP (Vosjan et al. 1990; Goes et al. 1994), esta reducción en el suministro de ATP probablemente podría explicar la disminución selectiva en la producción de PUFAs en algas expuestas a UVR. También, el grado de insaturación de AG, ha sido considerado como uno de los factores más importantes que controlan la fluidez y funcionalidad de las membranas del cloroplasto por lo que es posible suponer que los cambios en el contenido de AGs y su relación son necesarios para el reajuste de la estructura de las membranas de los cloroplastos de *H. cornea* para proporcionar el que ocurra el proceso fotosintético eficientemente bajo irradiancias variables (Khotimchenko & Yakovleva 2005). Sin embargo, en *H. cornea*, cultivada bajo radiación solar, el contenido en ácidos grasos con

insaturaciones aumenta considerablemente disminuyendo la cantidad de AGS. Además, el ácido palmítico, un ácido graso contenido en la biomasa, se redujo en un 32% ciento por los tratamientos empleados. Este AG se ha reportado recientemente como inductor de la metástasis (Pascual et al. 2016) por lo que convendría que no estuviera presente en alimentos para consumo humano o animal. La relación $\omega 6/\omega 3$, fundamental para una correcta actuación de estos AG en la salud humana, se mejora también por influencia de los tratamientos aproximándose a 1-2:1 (Simopoulos 2002, Simopoulos & DiNicolantonio 2016). La composición de AGs en el pool total de lípidos se encuentra influenciado por cambios dependientes de la luz (Guschina & Harwood 2006).

El contenido en proteínas para *H. cornea*, se incrementó alcanzando valores más altos bajo alta disponibilidad de N y bajo UVR solar, tal como se ha reportado en este género por otros autores (Aandira et al. 1999; Figueroa et al. 2012; Vo et al. 2015). La alta disponibilidad de nutrientes resulta indispensable para la reparación del daño inducido por UVR y para el suministro de energía en forma de ATP necesario para la resíntesis de proteínas dañadas (Murata et al. 2007). Tanto el N como el P en alta disponibilidad, han demostrado ser eficaces en la reducción de los daños relacionados con UVR (Shelly et al. 2005) y para acelerar la reparación celular (Heraud et al. 2005; Xu & Gao 2009). Estos mismos resultados han sido observados para las especies estudiadas en los **Capítulos 2 y 3** de esta presente Tesis Doctoral. Cabe destacar que los aminoácidos esenciales estudiados en *Gracilaria* sp. presentan un alto valor biológico (parecido al huevo usado como referencia en nutrición) lo cual implica que los aminoácidos esenciales presentes las proteínas de este género, son idóneos como de nutrientes tanto en alimentación humana como animal (Norziah & Ching 2000).

4.4. MAAs

Al producirse una mayor síntesis de compuestos nitrogenados con rol fotoprotector y antioxidante en presencia de $N-NH_4^+$ en el medio, *H. cornea* presenta una mayor capacidad de fotoprotgerse ante esta radiación y ante el daño oxidativo permitiendo así mantener el rendimiento fotosintético en niveles óptimos. Esta relación entre el aporte de NH_4^+ y el rendimiento fotosintético ya ha sido previamente estudiada por Korbee et al. (2005, 2006) en distintas especies de *Porphyra* observándose una menor caída del rendimiento fotosintético en las algas cultivadas con alta disponibilidad de N. Esto apoya el papel fotoprotector de los MAAs en *H. cornea*, ya que, las algas cultivadas en efluentes emulados al final del experimento (a los 35 días) tienen una concentración de MAAs de aproximadamente 16 veces más alta que las algas mantenidas en los tanques de stock. Recientemente, se ha demostrado el rol fotoprotector de los MAAs sobre el PSII en especies sometidas a UVR, los cuales contribuirían a mantener la integridad fotosintética evitando el daño inducido por UVR (Taira & Taguchi 2017).

En macroalgas rojas, la proporción de los distintos tipos de MAAs, cuando se estimula la síntesis de éstos, puede variar en cuestión de días (Karsten et al. 1998; Franklin et al. 1999). Se han observado cambios recíprocos en las concentraciones de Shinorine y Palythine en la macroalga *Chondrus crispus* y en el coral *Stylophora pistillata* (Shick & Dunlap 2002). Este mismo patrón se observó en *H. cornea* para este estudio, donde las cantidades de MAAs fluctuaron a lo largo del tiempo y en base al tratamiento experimental recibido. Por otro lado, las diferencias en la tasa de fotodegradación de los distintos MAAs parecen estar relacionadas con las características químicas de los radicales que componen la molécula de los 3 tipos de MAAs más predominantes encontrados en *H. cornea* al final del experimento (Palythanol, Shinorine y Porphyr-334). Estos MAAs poseen una estructura química más sencilla y presentan una menor tasa de fotodegradación (Whitehead & Hedges 2005). Se propone que éste sea el motivo por el que se detecta un incremento en la concentración de palythanol en algas cultivadas en presencia de UVR y alta disponibilidad de N.

Como ya se ha mencionado, la mayor acumulación de MAAs se produce en presencia de UVR y aporte elevado de N al medio, alcanzándose un valor máximo de 5.1 mg MAAs g⁻¹ de PS, valor superior al encontrado en otros estudios con esta misma especie pero inferior al hallado en especies del género *Porphyra*. El género *Porphyra* muestra tasas de crecimiento altas y su biomasa posee un alto valor económico debido a su uso en alimentación. No obstante, su ciclo de vida no es suficientemente conocido aún como para poder mantener cultivos anuales de la fase vegetativa (Neori et al. 2004) por lo que su uso como organismo biofiltrador está actualmente siendo estudiado (Kang et al. 2014; Silva et al. 2015; Wu et al. 2015). *Gracilaria* es un género ampliamente usado con fines biotecnológicos ya que su tecnología de cultivo es ya conocida. Su capacidad de incorporar nutrientes se encuentra entre las más altas (Andayani et al. 2016; López 2017). Por ello, a pesar de que el contenido en MAAs de *Porphyra* es considerablemente mayor al de *Gracilaria*, ésta última sigue presentándose como una mejor opción para el cultivo en sistemas de acuicultura multitrófica integrada. En el **Capítulo 1** de esta Tesis Doctoral, se evaluó también el contenido de *H. cornea* sin ser sometida a ningún tratamiento experimental, encontrándose valores de 0.2 mg MAAs g⁻¹ PS, posteriormente, en el **Capítulo 2**, bajo un tratamiento UVR próximo al solar y alta disponibilidad de nutrientes (150 µM de N-NH₄⁺), se elevó el contenido a 1 mg MAAs g⁻¹ PS, lo cual pone de manifiesto la capacidad inductora de esta especie cuando es sometida a UVR con alta disponibilidad de nutrientes. Por tanto, esta especie puede ver incrementado su contenido de MAAs (mg g⁻¹ PS) en 25 veces respecto a las condiciones normales empleando tratamientos fotorreguladores en un ambiente de alta disponibilidad de nutrientes.

La eficiencia de un sistema de cultivo se basa en el mantenimiento de los stocks de las especies cultivadas considerando sus respectivos requerimientos de agua y nutrientes (fundamentalmente N y P) y el rendimiento de la sustancia de interés, en este caso los metabolitos que se pretendan obtener. Desde un punto de vista biotecnológico interesa maximizar la productividad de MAAs (mg MAAs m⁻²

² d⁻¹), es decir no es el contenido de MAAs (mg g⁻¹ PS) sino el producto del contenido celular de MAAs por la productividad de la biomasa (g PS m⁻² d⁻¹). La productividad de MAAs en *H. cornea* bajo radiación solar y condiciones de cultivo empleadas en este estudio es similar o mayor al reportado en otras especies crecidas también en efluentes de piscifactoría o con niveles alto de N-NH₄⁺ como en este trabajo (Tabla 4.10).

Tabla 4.10. Composición de aminoácidos tipo micosporina (MAAs) y productividad de MAAs en especies de rodófitas

Especies	MAAs	Productividad	Referencias
	mg g ⁻¹ PS	mg MAAS m ⁻² d ⁻¹	
<i>Asparagopsis armata</i>	1.3-2.7	115.7-142.8	(Figuerola et al. 2008)
<i>Gracilaria conferta</i>	0.5-2.4	7.0-37.2	(Figuerola et al. 2010)
<i>Hydropuntia. cornea</i>	1.0-2.4	5.6-12.9	(Figuerola et al. 2012)
<i>Gracilaria vermiculophylla</i>	0.4-3.5	5.3-106.1	(Barceló-Villalobos et al. 2017)
<i>*Hydropuntia cornea</i>	1-5	113-253	Álvarez-Gómez (este estudio)

**Hydropuntia cornea* evaluada en este capítulo.

El rendimiento promedio máximo, se obtuvo en el caso de los cultivos en exterior con aporte de NH₄⁺. En cualquier sistema de acuicultura existen ciclos diarios de alimentación/excreción de los peces, es por ello que en este proyecto se utilizó un flujo de N constante a lo largo del día ajustado a 10-150 µM h⁻¹. No obstante, en este estudio no se han evaluado la NUE y la NUR a lo largo de la noche o en situaciones de escasa radiación que pudieran tener lugar de forma puntual afectando a la fotosíntesis, por lo que una monitorización de estas variables en estas condiciones sería de gran utilidad a la hora de establecer los mecanismos de control de la producción de peces y del cultivo de las macroalgas.

Una de las sustancias que más “poder antioxidante” otorga a las distintas divisiones algales, son los compuestos fenólicos (Fernando et al. 2016). Mediante los análisis ANOVA no se observaron diferencias significativas para las variables T, L y N en cuanto a su contenido. Sin embargo, a través del análisis RDA, se observó, significativamente, una relación de estos compuestos respecto a la UVR y los nutrientes. Numerosos autores han encontrado correlación entre el aumento de la UVR y el N con la producción de compuestos fenólicos (Stowe & Osborn 1980; Ilvessalo & Tuomi 1989; Cabello-Pasini et al. 2011). Los compuesto fenólicos, caracterizados comúnmente como compuestos producidos como resultado de una condición estresante, están implicados en los mecanismos de fotoprotección frente a UVR (Freile-Pelegri & Robledo 2014), por lo tanto, niveles más altos de antioxidantes son de vital importancia para soportar el estrés fotooxidativo provocado por una capacidad de utilización de energía reducida (Okamoto et al. 2001). La investigación sobre las concentraciones de compuestos fenólicos de algas ha demostrado que estos compuestos varían según la estación, el hábitat y los factores ambientales locales como la salinidad, temperatura, CO₂, UVR,

irradiancia PAR y disponibilidad de nutrientes (Hemmi & Jormalainen 2002; Svensson et al. 2007; Celis-Plá et al 2014, 2016, 2017).

Respecto a la capacidad antioxidante llevada a cabo por los mecanismos antioxidantes enzimáticos, se ha demostrado que la exposición a UVR induce la actividad de superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX) y catalasa (CAT) en algas (Lesser 1996; Malanga et al. 1997; Kannaujiya & Sinha 2017). Sin embargo, en *H. cornea*, solo se observaron valores más altos de SOD en la primera semana de experimentación para los tratamientos con baja disponibilidad de nutrientes y bajo radiación solar. Los niveles de CAT se también se redujeron al igual que SOD. Este descenso en los niveles de CAT concuerda con los resultados obtenidos por Kannaujiya & Sinha, (2017) para el alga verde *Chlorococcum* sp. Solamente APX, GR y GPX se vieron afectadas a lo largo del tiempo por efecto interactivo del tiempo, la radiación y la disponibilidad de nutrientes. Los niveles de APX si se vieron aumentados en los tratamientos para la biomasa cultivada en alta disponibilidad de nutrientes bajo radiación solar para la última semana de experimentación (35 d). Por último, las peroxidases totales (POX), aumentaron en todos los tratamientos aunque no fue significativo estadísticamente. Por lo tanto, los sistemas antioxidantes que se incrementan en *H. cornea*, deberían desempeñar un papel vital en la protección esta especie contra el daño causado por los radicales libres generados en primera instancia por un estresor. Debido a los resultados obtenidos, no queda clara una evidencia entre la relación existente entre los nutrientes, la radiación UVR solar y el tiempo en el sistema enzimático de *H. cornea*.

El contenido de antioxidantes totales (enzimáticos y no enzimáticos) se evaluó con el método ampliamente utilizado, el ensayo ABTS (Re et al. 1999), el cual proporciona una visión general e integradora, además de los efectos sinérgicos, de la defensa antioxidante que opera en *H. cornea* debido a las variables objeto de estudio para este experimento. La capacidad antioxidante total de *H. cornea*, aumentó considerablemente en todos los tratamientos desde los valores iniciales de 10.4 hasta valores máximos de 68.5 $\mu\text{mol TEAC g}^{-1}$ PS (6 veces más) como consecuencia de la disponibilidad de nutrientes y de la evolución del estrés acumulado a lo largo del tiempo. El análisis RDA, al igual que el análisis ANOVA reveló que, de las variables dependientes estudiadas, el N explicaba este aumento.

4.5. Síntesis de la discusión

Schuenhoff et al. (2003) desarrollaron un modelo para el escalado de un sistema de acuicultura integrada basado en el cultivo de *Sparus aurata* y *Falkenbergia rufulanosa*. Según este modelo, con un área de biofiltración de 28 m², se obtenía una productividad de biomasa de 6.1 kg PF d⁻¹ y una eficiencia de biofiltración del 50% de los efluentes generados diariamente por 1 tonelada de *S. aurata*. No se han descrito aún modelos de escalado de sistemas de acuicultura integrada en los que *H. cornea* sea la especie biofiltradora, pero como una primera aproximación, se presentan la eficiencia de

biofiltración y el rendimiento de la biomasa que se obtendrían si el área de biofiltración fuese 28 m², siendo por ello los tanques de mayor capacidad a los utilizados en los experimentos de esta Tesis Doctoral. Es preciso considerar que los datos de productividad presentados, están referidos al flujo de entrada de nutrientes). En sistemas a escala real este flujo es mucho mayor y no sería constante, dependiendo de la excreción de N-NH₄⁺ por los peces a lo largo de un ciclo diario. Por lo tanto, estos valores de productividad se incrementarían dentro de unos límites.

Es necesario abordar, que la alta acumulación de biomasa en los tanques puede tener consecuencias bio-ópticas en el cultivo de *H. cornea* debido a efectos de sombreado que puedan originarse, con la consiguiente disminución de la penetración de la luz. Por lo tanto, se precisa estudiar las necesidades de aireación e hidrodinamismo de *H. cornea* en tanques de más capacidad (> 90 L) para optimizar el cultivo de esta especie y mantener las condiciones óptimas de cultivo logradas en este estudio. El suministro de nutrientes y la radiación solar completa (presencia de UVR) tienen un efecto positivo sobre la tasa fotosintética (ETR_{max}) en *H. cornea*. La disminución en la productividad de biomasa a pesar del aumento de la actividad fotosintética y la tasa de captación de N, se explica debido a que las algas, a través del tiempo, podrían invertir más energía en acumulación de metabolitos (carbohidratos y compuestos antioxidantes) que en crecimiento. En cualquier caso, la mayor acumulación de carbohidratos y la actividad antioxidante se observó en los tratamientos asociados a las mayores condiciones de estrés, es decir LN y cultivo bajo radiación solar. Como era de esperar, el bajo suministro de N conlleva una mayor eficiencia de uso (NUE) el cual disminuyó, pero el NUR fue justamente a la inversa. Las algas crecidas en efluentes simulados de piscifactoría muestran una alta tasa de biofiltración de N inorgánico y una acumulación de compuestos nitrogenados, como sustancias fotoprotectoras y antioxidantes, como los MAAs (Figuerola et al. 2012) y compuestos carbonados para usos nutricionales o la producción de bioenergías. En este estudio, la actividad antioxidante fue mucho mayor que la reportada en otras algas marinas (Matanjun et al. 2008). Así pues, los valores más altos de los compuestos de interés que se alcanzaron de forma máxima, quedan recogidos en la Tabla 4.11. Los niveles más altos de proteínas, Chl_a, ficobiliproteínas, MAAs, compuestos fenólicos, Omega-3 y Omega-6, entre otros se alcanzaron en cultivos con alta disponibilidad de N pero según el compuesto de su productividad fue mayor dependiendo de si fue cultivada dentro (invernadero con radiación natural filtrada) o fuera (al sol con radiación natural). Por el contrario los carbohidratos y lípidos se acumularon preferentemente en baja disponibilidad de N y en condiciones de radiación solar natural. La mayor parte de los compuestos alcanzaron su máxima acumulación en los últimos periodos de cultivo (35 d)

Tabla 4.11. Valores máximos para las variables dependientes estudiadas respecto a los tratamientos y tiempo en el que se alcanza durante el experimento.

Variable	Valores máximos	Tratamiento	Día de cultivo
NUE (%)	98.6 ± 0.3	LN-G, LN-O	7
NUR (mmol N m ⁻² h ⁻¹)	38.4 ± 5.7	HN-O	14
Proteínas (% PS)	24.9 ± 0.4	HN-G	35
Lípidos (% PS)	3.9 ± 0.3	LN-O	35
Carbohidratos (% PS)	49.6 ± 9.4	LN-O	28
Chla (µg g ⁻¹ PS)	443.9 ± 32.9	HN-G	28
Carotenoides (mg g ⁻¹ PS)	162.4 ± 10.1	HN-G	28
FC (mg g ⁻¹ PS)	1.2 ± 0.3	LN-O	21
FE (mg g ⁻¹ PS)	5.3 ± 0.9	HN-G	28
MAAs (mg g ⁻¹ PS)	5.2 ± 0.5	HN-O	35
Compuestos fenólicos (mg g ⁻¹ PS)	55.9 ± 10.8	HN-O	35
PUFAS (%)	32.9 ± 9.4	HN-O	35
Omega-3 (%)	24.6 ± 2.0	LN-G	7
Omega-6 (%)	77.2 ± 1.5	HN-O	35
Omega-6/Omega-3 (ω6/ω3)	1.4 ± 0.2	LN-O	7
ABTS (µmol TEAC g ⁻¹ PS)	21.3 ± 1.8	HN-G	35

La realización de un estudio económico detallado del sistema de acuicultura multitrófica integrada por *H. cornea* propuesto en esta Tesis Doctoral es compleja debido a la gran cantidad de variables (biológicas de cada especie, económicas, sociales y medioambientales) a tener en cuenta. En una primera aproximación, se pueden mencionar como factores claves a considerar en este estudio, el coste de la tierra, la energía y la mano de obra (fundamentales en cualquier estudio económico). Para el cultivo exitoso de esta especie, es necesario tener acceso a agua de mar constante mediante flujos abiertos los cuales tienen un coste energético asociado (fundamentalmente por consumo de bombas hidráulicas). También, se han de tener en cuenta los costes referentes al mantenimiento de las instalaciones o costes derivados del cumplimiento de la normativa vigente relacionada con las actividades acuícolas. Además de esto, entre otros muchos factores, hay que destacar el esfuerzo de marketing necesario para lograr rentabilidad económica en los productos algales obtenidos a partir de este sistema y debe existir una demanda de mercado para los bioproductos producidos.

5. Conclusiones

Los resultados presentados en este capítulo de la presente Tesis Doctoral, ponen de manifiesto que la especie *H. cornea* puede ser empleada como biofiltro para la eliminación de N (NH₄⁺) mostrándose como una especie de gran interés para ser utilizada en sistemas de acuicultura integrada ya que, además, permite el uso de su biomasa como fuente de sustancias de interés económico. De esta forma, en el presente estudio, se ha propuesto como una especie con una alta eficiencia de biofiltración

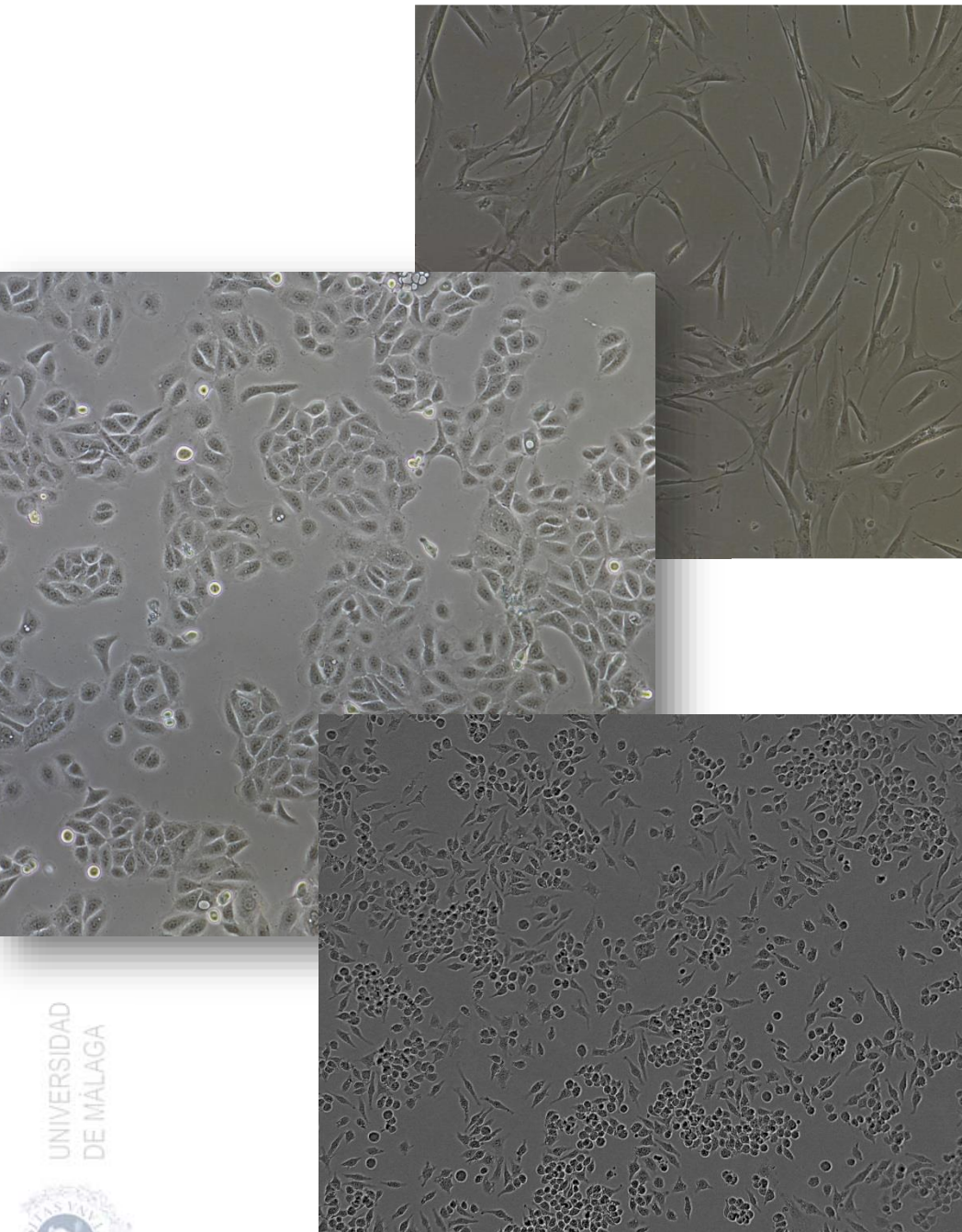
de N y rendimiento de productividad de compuestos bioactivos. Los resultados positivos obtenidos en este estudio dejan abierta la posibilidad de realizar ensayos posteriores que permitan el diseño de un modelo más óptimo para el escalado del sistema con fines comerciales. *H. cornea* puede actuar como un eficiente biofiltrador de N-NH_4^+ alcanzando valores de NUE cercanos al 100%, siendo este valor máximo (99%) cuando el cultivo recibe UVR manteniendo una productividad fotosintética óptima. Se reconoce que las técnicas de fluorescencia no pueden suplantar las técnicas basadas en carbono o basadas en el intercambio de gases para medir la productividad, debido en parte a su incapacidad de explicar la respiración y por las razones explicadas anteriormente. Sin embargo, sugerimos un enfoque basado en la fluorescencia como el descrito aquí puede proporcionar un proxy útil para la productividad.

La mayor acumulación de compuestos bioactivos se produce en los tratamientos con alta disponibilidad de NH_4^+ en el medio y en presencia de UVR por lo que se refuerza la tesis sobre el efecto estimulador de esta radiación sobre el metabolismo del nitrógeno. La UVR y la disponibilidad de N en el medio afectan a la proporción de los tipos de MAAs encontrados en *H. cornea*. La productividad de compuestos bioactivos alcanzada fue alta respecto a otras especies ya estudiadas. Esto abre la posibilidad de explotación de la biomasa de *H. cornea* para la extracción de compuestos bioactivos, entre los que destacarían los MAAs de gran interés cosmeceútico. Los tratamientos empleados producen una estimulación tanto de los sistemas antioxidantes enzimáticos como de los sistemas no enzimáticos. La síntesis de compuestos con capacidad antioxidante dota a esta especie de una alta capacidad de detoxificación derivada de los estresores UVR y de la baja disponibilidad de N en el medio. Las tratamientos experimentales también tuvieron repercusión sobre el metabolismo lipídico de *H. cornea*. Estos resultados evidencian que esta especie es capaz de regular el metabolismo de los lípidos dependiendo de las condiciones lumínicas modificando el contenido de lípidos totales y la composición de los ácidos grasos (aumento del número de insaturaciones).



Capítulo 5

Ensayos de citotoxicidad e inmunológicos en extractos
algales de *Hydropuntia cornea* y *Gracilariopsis*
longissima (Rhodophyta)





Ensayos de citotoxicidad e inmunológicos en extractos algales de *Hydropuntia cornea* y *Gracilariopsis longissima* (Rhodophyta)

5

1. Resumen

En el **Capítulo 5**, se estudió la citotoxicidad y la capacidad inmunológica de extractos acuosos concentrados por rotavaporación de dos de las algas que presentaron la mejor bioactividad en los extractos: *H. cornea* (**Capítulos 1, 2 y 4**) y *G. longissima* (**Capítulos 1, 2 y 3**). Este estudio fue diseñado para evaluar el uso potencial de los extractos en cosmeceútica y sobre la bioseguridad de los extractos. La toxicidad de los extractos fue evaluada mediante el ensayo MTT, el cual se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol por acción de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa. Este ensayo se realizó *in vitro* en tres líneas celulares: una relacionada con el sistema inmunológico, (macrófagos murinos del sistema inmunitario: RAW 264.7), y dos con líneas celulares humanas relacionadas con la piel (fibroblastos gingivales, HGF; y queratinocitos humanos inmortalizados, HaCaT). Ambos extractos no mostraron actividad citotóxica en células humanas (HaCaT y HGF), aunque sí mostraron citotoxicidad en células murinas tumorales del sistema inmune (macrófagos RAW 264.7), por lo que su uso en productos cosméticos en relación con la salud y seguridad, queda en gran parte garantizado. Por otro lado, se estudió la actividad inmunológica en macrófagos murinos RAW 264.7 a una concentración menor de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y más baja que el EC_{50} , mediante la producción de compuestos pro-inflamatorios a través de un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) o anti-inflamatorios/proinflamatorios como la interleucina-6 (IL-6). Los resultados mostraron que los extractos de *H. cornea* y *G. longissima* indujeron de forma exponencial la biosíntesis de ambos. La producción de TNF- α fue mucho más alta que la observada en el control (lipopolisacárido bacteriano, LPS) cuando la concentración de los extractos acuosos empleados fue mayor de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Estos resultados indican por primera vez que los extractos de *H. cornea* y *G. longissima* inducen activamente la producción de citoquinas. En consecuencia, el objetivo de este estudio fue caracterizar los extractos de *H. cornea* y *G. longissima* para evaluar su efecto sobre la síntesis de citoquinas por los macrófagos, y la toxicidad celular (citotoxicidad) en tres líneas celulares (RAW 264.7, HGF y HaCaT) y así establecer posibles roles como potenciales inmunomoduladores.

2. Material y métodos

En este capítulo, se planteó la realización de ensayos *in vitro* para el estudio de los efectos citotóxicos e inmunomoduladores de los extractos de *H. cornea* y *G. longissima*. Para ello, primeramente se obtuvieron extractos de *H. cornea* y *G. longissima* mediante extracción con un solvente acuoso (H_2O) de acuerdo a la metodología descrita en el **Capítulo 1**. A partir de estos extractos liofilizados, se pesaron 20 mg y se disolvieron en medio de cultivo DMEN. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas (hasta alcanzar una dilución 1:512) con la finalidad de estudiar los efectos de la concentración de los extractos algales en la viabilidad celular mediante el ensayo MTT y en tres líneas celulares empleadas: RAW 264.7, HGF y HaCaT. Para estudiar la capacidad inmunomoduladora de los extractos, se realizaron los inmunoensayos para las citoquinas TNF- α y IL-6), utilizando los mismos extractos de *H. cornea* y *G. longissima*, pero a una concentración mil veces más baja ($0-100 \mu g mL^{-1}$) (ver Material y métodos generales, Ep. 17).

3. Resultados

3.1. Ensayos de citotoxicidad

La prueba de viabilidad celular mediante la incubación de las líneas celulares en una solución de MTT, previa incubación de dichas células durante 72 h a los extractos algales, determinó el grado de afectación causado por los extractos algales. Basándose en este ensayo, se observó que en las células de macrófagos (RAW 264.7) después de 72 h de incubación con los extractos, se obtuvieron valores de toxicidad celular expresada como EC_{50} de 0.41 y 0.12 $mg mL^{-1}$ para *G. longissima* y *H. cornea*, respectivamente (Tabla 5.1; Figura 5.1).

Tabla 5.1. Resumen para los valores de EC_{50} en las diferentes líneas celulares estudiadas. En HaCaT no se encontró toxicidad para los extractos de *G. longissima*

Especies	$EC_{50} (mg mL^{-1})$		
	RAW 264.7	HGF	HaCaT
<i>G. longissima</i> (Gl)	0.41	4.2	-
<i>H. cornea</i> (Hc)	0.12	250.7	259.5

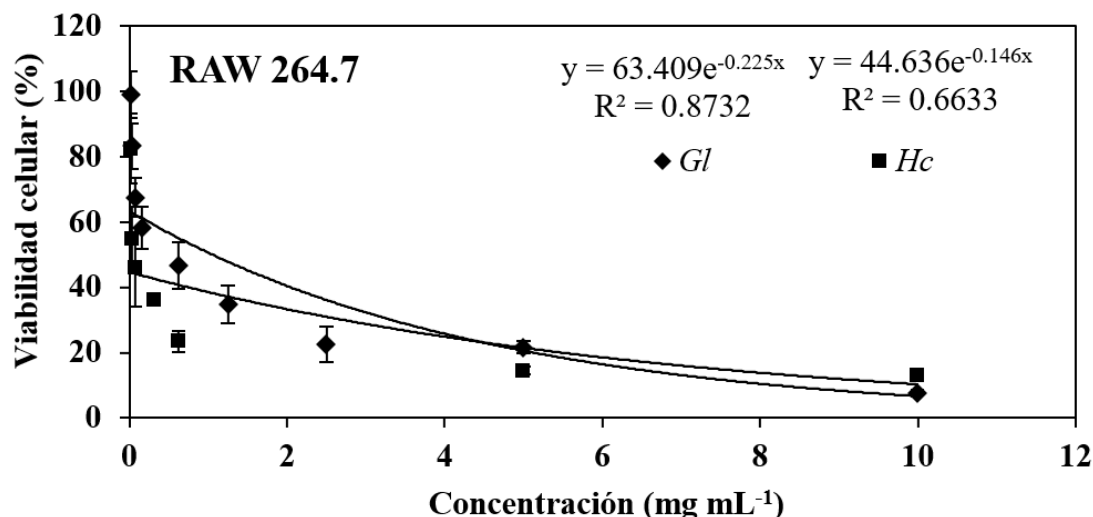


Figura 5.1. Efecto de los extractos acuosos de *Hydropuntia cornea* (*Hc*) y *Gracilariopsis longissima* (*Gl*) en la viabilidad celular (citotoxicidad) de la línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7. Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de extracto (0–10 mg mL⁻¹) durante 72 h y evaluadas mediante el ensayo MTT.

Los resultados sobre la citotoxicidad de los extractos algales frente a la línea celular de fibroblastos humanos (HGF) a través del ensayo de MTT se muestran en la Tabla 5.1. Basándose en los datos obtenidos, se concluyó que 4.2 mg mL⁻¹ de extracto de *G. longissima* y 250.7 mg mL⁻¹ de extracto de *H. cornea* mostraron efectos significativos en la integridad celular (Tabla 5.1. Figura 5.2).

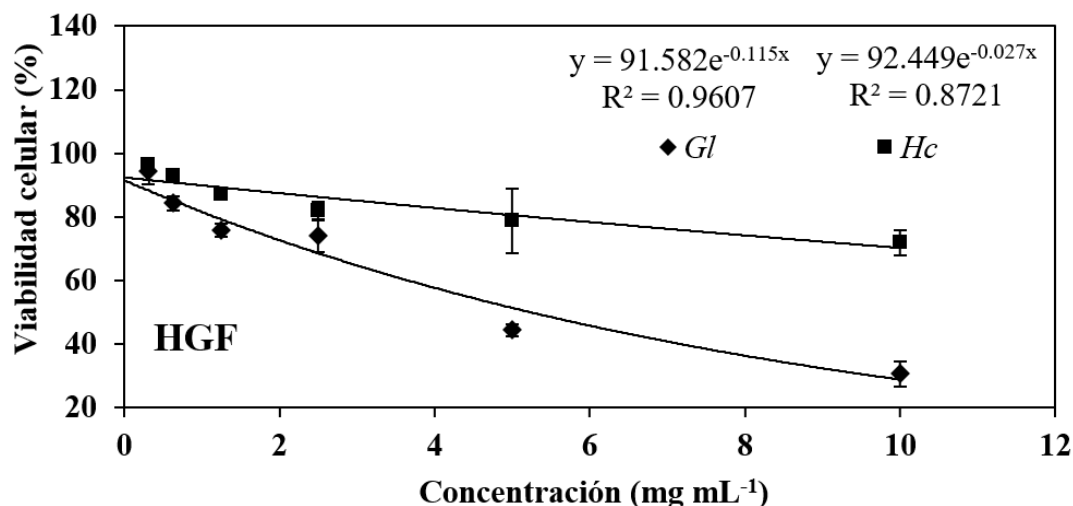


Figura 5.2. Efecto de los extractos acuosos de *Hydropuntia cornea* (*Hc*) y *Gracilariopsis longissima* (*Gl*) en la viabilidad celular (citotoxicidad) de la línea celular HGF-fibroblastos gingivales. Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de extracto (0-10 mg mL⁻¹) durante 72 h y evaluadas mediante el ensayo MTT. Los ensayos se realizaron por triplicado y se expresaron como SE de la media.

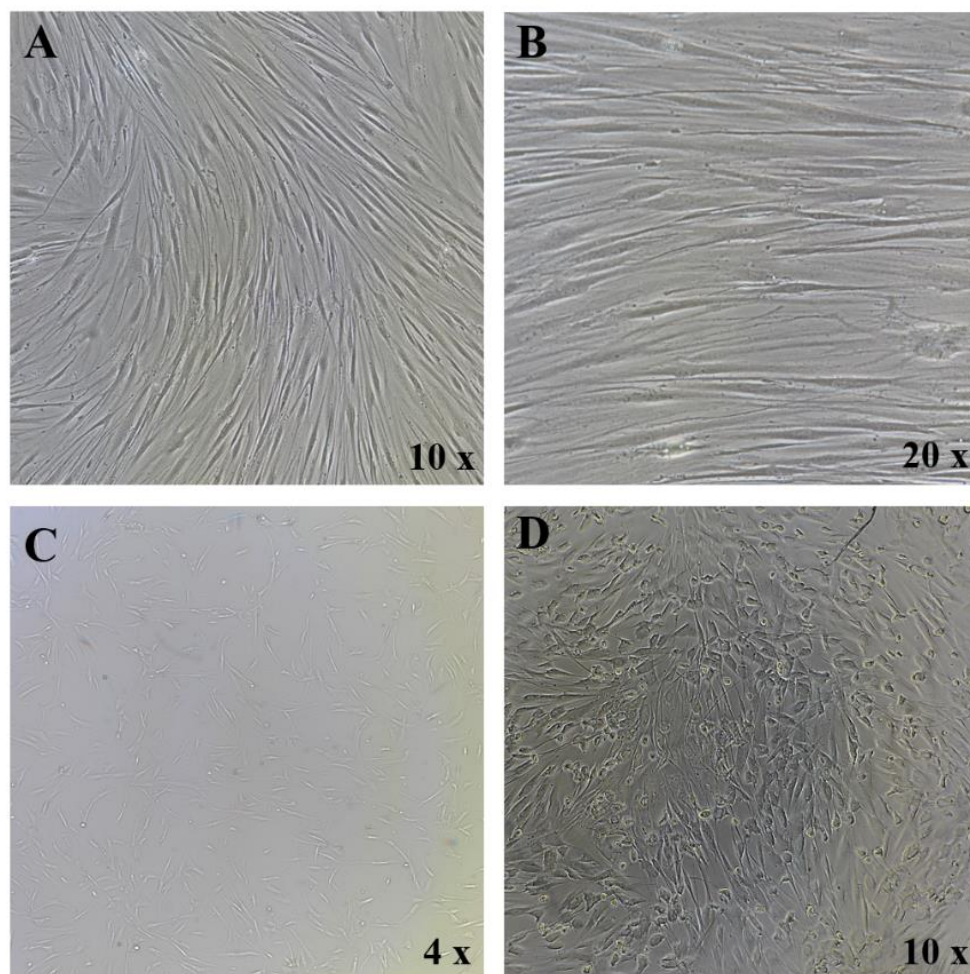


Figura 5.3. Fibroblastos gingivales (HGF) empleados en el estudio observados al Fotomicroscopio Nikon Eclipse Ti (cámara DS-R12). (A: 10x, B: 20x) y en placa el primer día de cultivo (C: 4x) y a los tres días (D: 10x).

En la línea celular HaCaT, mediante el ensayo de MTT no se observaron efectos biológicos en las células incubadas con *G. longissima*, mientras que en *H. cornea* se observó que 259.5 mg L⁻¹ de extracto mostraron una reducción de la viabilidad celular del 50%, en esta línea celular (Tabla 5.1. Figura 5.4)

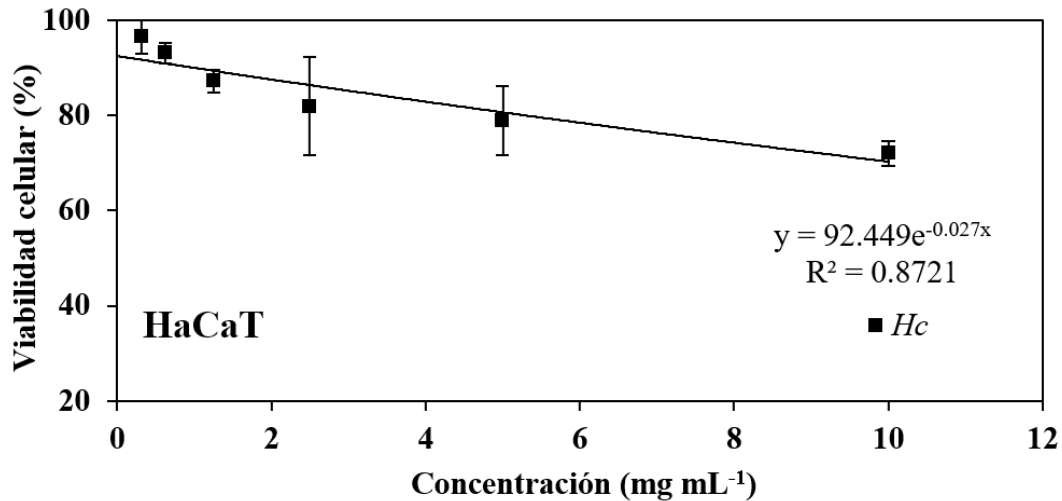


Figura 5.4. Efecto de los extractos acuosos de *Hydropuntia cornea* (*Hc*) en la viabilidad celular (citotoxicidad) de la línea celular HaCaT- queratinocitos humanos. Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de extracto (0-10 mg mL⁻¹) durante 72 h y evaluadas mediante el ensayo MTT. Los ensayos se realizaron por triplicado y se expresaron como SE de la media.

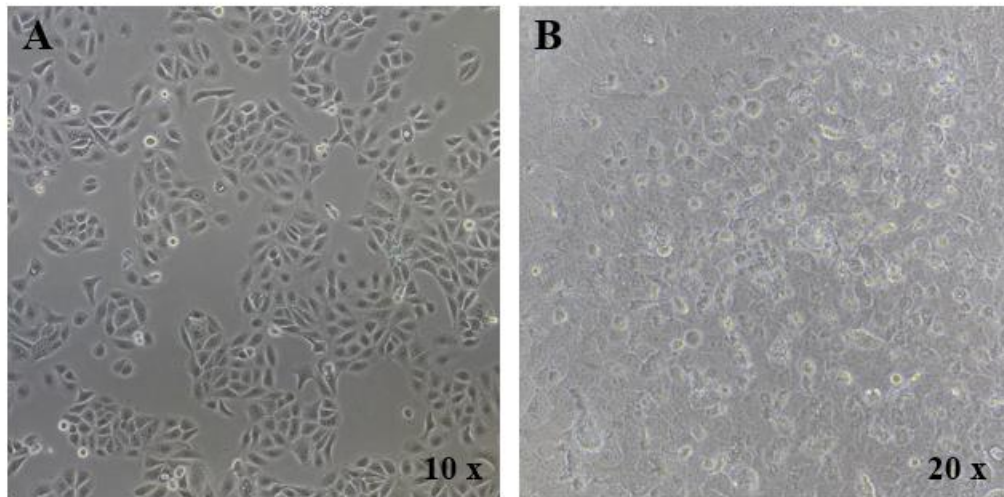


Figura 5.5. Queratinocitos humanos (HaCaT) empleados en el estudio observados al Fotomicroscopio Nikon Eclipse Ti (cámara DS-R12). (A: 10x, B: 20x).

3.1. Inmunología

La síntesis y acumulación de citoquinas se incrementó como una respuesta al incremento de la concentración de extracto de *H. cornea* y *G. longissima* donde la sensibilidad del método fue de 4 pg mL⁻¹. El control para LPS (lipopolisacárido bacteriano inductor del sistema inmune) en TNF- α fue de 23.8 ± 7.8 y en IL-6 de < 4 pg mL⁻¹. Se observó un incremento exponencial de 11 veces más de TNF- α a medida que la concentración de los extractos se incrementó de 0 a 100 μ g mL⁻¹ en *G. longissima*, y de 12 veces más en *H. cornea* (Fig. 5.6A). La producción de TNF- α fue significativamente más alta

que la del control cuando la concentración de los extractos de ambas especies, fue mayor que $5 \mu\text{g mL}^{-1}$. De manera similar a la tendencia del $\text{TNF-}\alpha$, los niveles de IL-6 se incrementaron linealmente de 50 a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ en *G. longissima*, mientras que en *H. cornea*, se observó un incremento lineal pero con muy baja pendiente a estas mismas concentraciones de extracto (Fig. 5.6B).

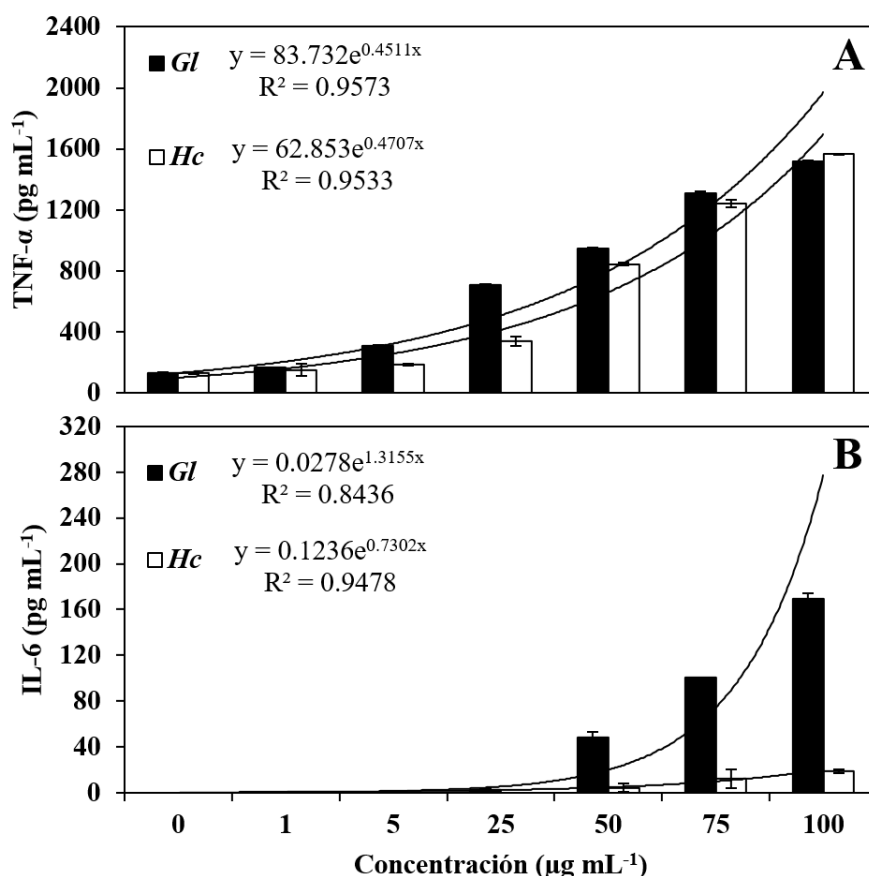


Figura 5.6. Concentración del factor de necrosis tumoral ($\text{TNF-}\alpha$) sintetizada por los macrófagos RAW (pg mL^{-1}) (A) y producción de interleucina-6 (IL-6 pg mL^{-1}) por los macrófagos RAW (B) expuestos a diferentes concentraciones de extractos de *H. cornea* y *G. longissima*. Los símbolos representan el promedio de tres muestras \pm SE. Las barras de error no mostradas son más pequeñas que los símbolos.

4. Discusión

Para el estudio de la citotoxicidad de los extractos, se emplearon concentraciones mayores a las empleadas en la bibliografía (mg mL^{-1} respecto a $\mu\text{g mL}^{-1}$) con la finalidad de establecer un valor de citotoxicidad más realista para posteriores usos potenciales de dichos extractos en productos biotecnológicos (Kazłowska et al. 2010).

4.1. Viabilidad celular

La reducción del MTT depende de las enzimas oxidorreductasas mitocondriales dependientes de NADPH (Berridge & Tan 1993; Berridge et al. 2005) lo que es indicativo del estado fisiológico. Por lo tanto, la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán (metabolito de la degradación del MTT) producido (Van Meerloo et al. 2011). En este estudio, los extractos de *H. cornea* y *G. longissima* tuvieron un efecto citotóxico a bajas concentraciones sobre las células RAW 264.7 medido mediante el ensayo MTT. A estas especies algales, se les atribuye altos contenidos en varios compuestos fenólicos halogenados (Kladi et al. 2004) los cuales podrían poseer capacidad citotóxica en algunas líneas celulares presentando capacidad antioxidante, antimicrobiana, anticancerígena y antidiabética (Liu et al. 2011), además de los MAAs los cuales presentan efectos protectores contra la apoptosis inducida por UVB y la fragmentación del ADN a través de la modulación de las caspasas (Suh et al. 2017).

En un estudio donde se emplearon extractos acuosos de *Gracilaria corticata* por su probable actividad antitumoral frente a las líneas celulares Jurkat y molt-4 (líneas celulares leucémicas humanas), se observó una buena actividad contra la replicación de las células tumorales. La concentración más eficaz contra Jurkat y las células molt-4 fue de 9.3 y 9.7 mg mL⁻¹ respectivamente por lo que concluyeron que el extracto de esta especie no mostró un efecto citotóxico considerable contra las células molt-4 pero sí se demostró su efecto citostático en cuanto a la inhibición en el desarrollo y multiplicación de las células tumorales. El número de células senescentes relacionadas con las células Jurkat fue mayor que las células molt-4.

Con respecto a la viabilidad celular observada en fibroblastos gingivales humanos HGF, se observaron diferencias entre los efectos citotóxicos originados por los extractos. *G. longissima* tiene un efecto citotóxico alrededor de 59 veces mayor que *H. cornea* en lo que a valores de EC₅₀ respecta. Las algas rojas de este estudio, debido a su alta concentración y productividad de en aminoácidos tipo micosporina (MAAs), resultan interesantes para uso en cosméticos. Así pues, la viabilidad celular y la toxicidad en líneas celulares relacionadas con las dermis, son criterios críticos para la evaluación de los extractos que se obtengan con estas especies. Un estudio, realizado según el ensayo de toxicidad a corto plazo recomendado por la Organización Internacional de Normalización (ISO) (ISO 10993-12), reveló que no existe toxicidad por los MAAs, incluyendo Shinorine, Porphyrin-334 y Micosporine-glycine en fibroblastos murinos. Esto se confirmó en un segundo ensayo de incubación directa a más largo plazo en la misma línea celular. Después de 14 y 21 días de incubación, con los diferentes MAAs, no hubo toxicidad significativa y sólo se observaron efectos menores sobre la morfología celular para algunos de los MAAs probados (Fernandes et al. 2015). Otro estudio demostró que estos mismos tres

MAAs no eran tóxicos en células de fibroblastos de pulmón humanos (TIG-114) a concentraciones entre 0-100 μM a las 48 h, y en realidad aumentaban la proliferación celular (Oyamada et al. 2008) efecto confirmado por Kim et al. (2014) al estudiar la viabilidad de estos mismos aminoácidos. Porphyr-334 también ha demostrado no tienen ningún efecto sobre la viabilidad celular de la piel humana fibroblastos en concentraciones de hasta 200 μM (Ryu et al. 2014).

Con respecto a HaCaT, ninguno de los extractos mostró toxicidad sobre esta línea celular. Solo en *H. cornea*, a muy elevadas concentraciones, se observó una reducción de la viabilidad celular expresada como EC_{50} (259.5 mg mL^{-1}). Por el contrario, *G. longissima* mostró incluso un aumento de la viabilidad celular más allá del 100%. Resultados similares con estos hallazgos, se encontraron estudiando los MAAs Shinorine, Porphyr-334 y Micosporine-glycine los cuales, de forma aislada, redujeron significativamente la viabilidad celular en los queratinocitos HaCaT en diferentes proporciones a concentraciones de 0.1 mg mL^{-1} y superiores (Choi et al. 2015). Por otro lado Fernandes et al. (2015) encontraron que el aminoácido Micosporine-Glycine inmovilizado en un biofilm de quitosano induce la proliferación celular (fibroblastos murinos L-929) Por lo tanto, estos MAAs presentes en *H. cornea* y *G. longissima* (4.8 y 1.62 $\text{mg MAAs totales g}^{-1}$ PS en los experimentos de esta Tesis Doctoral) demuestran poseer efectos sobre la proliferación celular al no causar disminución de la misma tal como reportaron Choi et al. (2015). Existen, además, varios estudios que demuestran que los MAAs previenen la toxicidad inducida por UVR. Este efecto protector también se ha demostrado en la colemina A (un compuesto con una estructura química relacionada con MAA), donde la exposición UVB de queratinocitos HaCaT a través de una placa de cuarzo revestida con este metabolito, produjo un aumento en la viabilidad celular demostrando, por tanto, un efecto proliferativo (Torres et al. 2004).

En otro experimento *in vitro* donde se expusieron fibroblastos a radiación UVA, observaron que la aplicación de Porphyr-334 a concentraciones de 10-40 μM en las células también impedía la reducción de la viabilidad celular y la inducción de la senescencia (Ryu et al. 2014), por lo tanto, la aplicación de este aminoácido después de la exposición a UVR, contribuye a una mayor viabilidad celular en comparación con el control por lo que estos resultados avalarían el uso de este metabolito en cremas post-solares. Suh et al. (2017), encontraron que la tasa de proliferación de células HaCaT irradiadas con UVR se ve reducida significativamente (hasta tres veces) en comparación con las células no irradiadas. Bajo la exposición a UVR, las células HaCaT mostraron un aumento en la viabilidad celular después del tratamiento con Porphyr-334. En particular, el pretratamiento con Porphyr-334 atenuó los efectos inhibitorios de la UVR, dando lugar a tasas de supervivencia celular elevada en HaCaT (hasta un 88%), en comparación con las células no irradiadas. Este mismo estudio sugiere que Porphyr-334 contribuiría a la mitigación de la apoptosis inducida por UVR y la fragmentación del ADN. Para determinar si Porphyr-334 afectaba la vía metabólica de las caspasas en células HaCaT,

se midieron los niveles de proteína caspasa-3. Tras la irradiación de células HaCaT, se observó claramente la activación de la caspasa-3 (basada en la disminución de la expresión de procaspasa-3). El estudio reveló la atenuación de la señalización apoptótica en células tratadas con *Porphyra*-334. En particular, los niveles de procaspasa-3 y caspasa-3 activa en las células tratadas con *Porphyra*-334 se restablecieron al ~ 80% de los niveles de control, lo que implicaba que la protección de las células frente al daño por UVR por *Porphyra*-334 estaba parcialmente mediada por la supresión de la activación de la caspasa.

4.2. Producción de citoquinas

Este estudio demuestra que los extractos acuosos de *G. longissima* y *H. cornea* estimulan la producción de citoquinas tanto de TNF- α como IL-6 en macrófagos de la línea celular RAW 264.7. Esta activación puede ser debida a que, esta especie, contienen compuestos químicos con propiedades antiinflamatorias atribuidas a una gran diversidad de metabolitos de distinta naturaleza (Fernando et al. 2016). Otros estudios han demostrado, que los extractos de algas incrementan la fagocidad y la actividad de secreción de los macrófagos (Yoon et al. 2009; Yang et al. 2012). Extractos del alga roja *Porphyra yezoensis* indujeron la producción de TNF- α tanto *in vitro* como *in vivo* para macrófagos murinos (Yoshizawa et al. 1995). Los polisacáridos ácidos de *Halopithys incurva* (especie estudiada en el **Capítulo 1** de la presente Tesis Doctoral) inducen la producción de IL-6 y de óxido nítrico (Abdala et al. 2011) mientras que los de la microalga roja, *Porphyridium cruentum*, inducen tanto TNF- α como IL-6 en macrófagos de la línea celular RAW 264.7 (Abdala-Díaz et al. 2010). De manera similar, Yim et al. (2005) demostraron que el exopolisacárido p-KG03 que contiene altos niveles de sulfato, producido por la microalga dinoflagelada *Gyrodinium impudicum* cepa KG03, incrementan la producción de citoquinas macrófagos, como IL-1 β y IL-6, así como TNF- α . En este estudio, los extractos de *G. longissima* y *H. cornea* también inducen la liberación de citoquinas mucho más que la observada para el inductor de citoquinas LPS (lipopolisacárido bacteriano) empleado como control, hasta 15 veces más para TNF- α , y 2 veces más para IL-6. Otros estudios con algas rojas de la familia Gracilariaceae, en concreto *Gracilaria verrucosa* (heterotipo de *Gracilariopsis longissima* para este estudio de acuerdo a Steentoft et al. (1995)), indican que son inhibidores de la producción de mediadores proinflamatorios (NO, IL-6 y TNF- α) debido a la bioactividad que ejercen dos ácidos grasos (C9 y C10) contenidos en su composición (Danga et al. 2008; Lee et al. 2009).

Otro estudio llevado a cabo por Saeidnia et al. (2012) revelaron que el colesterol es uno de los principales esteroides en el género *Gracilariopsis* tal como se ha reportado en la literatura científica para la mayoría de las algas rojas (Rhodophyta) las cuales contienen principalmente colesterol (Rao 1998). La concentración de colesterol, el esteroide típico en las algas rojas, también es importante en las algas pardas. El fucosterol, abundante en algas pardas, también se ha aislado de *Gracilariopsis persica*

(Kamenarska et al. 2003). Este metabolito ha sido reportado por su actividad antidiabética. La administración de fucosterol (oralmente) a 30 mg kg^{-1} en ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina indujo una disminución significativa de las concentraciones séricas de glucosa. Además, la administración de fucosterol (300 mg kg^{-1}) en ratas diabéticas inducidas por epinefrina inhibió el nivel de glucosa en sangre y la degradación del glucógeno (Lee et al. 2004). Por lo tanto, el fucosterol podría ser un principio antidiabético principal en las algas marinas del género *Gracilariopsis*. Además, se ha informado que el fucosterol es un esteroide antioxidante de las algas marinas mediante el aumento de las enzimas antioxidantes (Lee et al. 2003). Se ha informado que el compuesto β -sitosterol reduce los síntomas de la hiperplasia prostática de Benin (BPH) y también como agente antiinflamatorio (Wilt et al. 1999; Loizou et al. 2010).

Además, la composición en aminoácidos tipo micosporina (MAAs), considerados fotoprotectores naturales (entre muchos otros roles) y que se encuentran en la composición de las especies este estudio en cantidades moderadas, pueden ser explotados biotecnológicamente de diversas maneras en cuanto a estimulación celular. Hay evidencia de que los MAAs (tanto Shinorine, como Porphyrin-334 y Micosporine-glycine) protegen a los fibroblastos humanos de la UVR además de proteger a las células de la muerte celular inducida por UVR (Oyamada et al. 2008). Los estudios de las actividades antiproliferativas de MAAs extraídas de macroalgas rojas marinas, sugieren que los MAAs ejercen bioactividades farmacéuticas relevantes en el cuerpo humano. Los efectos inmunomoduladores de los MAA, Shinorine y Porphyrin-334 obtenidos de *Gelidium* sp. y *Ceramium* sp. se han investigado en líneas humanas y celulares (Becker et al. 2016). Los MAAs tienen aplicaciones potenciales crecientes en cosméticos, así como en fotoprotectores UVR (orales y tópicos) y que ahora se proponen como activadores de la estimulación celular.

Actualmente, en el mercado, ya existen preparaciones de polisacáridos de alto peso molecular, aislados de microalgas de grado alimenticio, como potenciadores del sistema inmune (ejemplo “Immulina” de *Spirulina platensis*, “Immunon” de *Aphanizomenon flos-aquae* e “Immurella” de *Chlorella pyrenoidosa*; (Pugh et al. 2001). Se ha comprobado que cada uno de estos polisacáridos incrementa sustancialmente los niveles de IL-1 β y TNF- α y son 10 veces más activos para la activación *in vitro* de macrófagos que las preparaciones que son utilizados clínicamente en la actualidad como inmunoterapéuticos. Según los resultados del presente trabajo, el incremento en las concentraciones de TNF- α originados por *G. longissima* y *H. cornea* ($1560 \mu\text{g mL}^{-1}$ de TNF- α en ambas especies) son mucho mayores que la inducción en *Spirulina platensis* ($30 \mu\text{g mL}^{-1}$ de TNF- α) encontrada por Parages et al. (2012).

Los resultados del presente trabajo indican que el efecto de los extractos acuosos de *H. cornea* y *G. longissima* sobre los macrófagos RAW puede deberse a las diferentes fracciones presentes en el

extracto. Sin embargo, se necesitan otros estudios para probar esta hipótesis, así como la experimentación con metabolitos aislados que demuestren, de manera individualizada, su efecto biológico sobre la producción de citoquinas en células del sistema inmunitario.

5. Conclusiones

La citotoxicidad originada por los extractos de *H. cornea* y *G. longissima* difiere en cuanto a la línea celular que se trate. A pesar de mostrar ligera toxicidad en macrófagos para ambos extractos algales, y en fibroblastos gingivales HGF para *G. longissima*. Las concentraciones empleadas en este estudio son elevadas debido a las indicaciones metodológicas para llevar a cabo los ensayos anteriores, ya que se pretende conocer el intervalo de concentraciones a la cual, la sustancia a testar es tóxica o inmunomoduladora. Aun así, las concentraciones de compuestos naturales en los preparados cosméticos son de hasta el 5% respecto al total del producto (Alcalde 2008), lo cual estaría lejos de causar toxicidad en líneas celulares fisiológicamente normales, por lo que el uso de estos componentes en preparados cosméticos, nutracéuticos o farmacológicos estaría totalmente garantizado. Aunque existe una falta de conocimiento acerca de los mecanismos moleculares implicados en la activación de macrófagos por extractos de algas, se ha sugerido que esta función inmune podría ser similar a la observada para plantas y metabolitos de hongos estudiados más en profundidad (Schepetkin & Quinn 2006). Los resultados de este estudio sugieren que los extractos acuosos de *H. cornea* y *G. longissima* podrían considerarse para estudios posteriores como productos nutracéuticos, cosméticos y farmacológicos potenciales que se aplicarían cuando fuese necesaria la activación de macrófagos en procesos inflamatorios. Estos podrían estimular la respuesta inmune de las células mediante la inducción de la producción de las citoquinas TNF- α e IL-6, entre otros en macrófagos, responsable de la respuesta inmune.

En este estudio, la concentración efectiva es mayor que otros estudios similares en los que se utilizaron compuestos bioactivos purificados o aislados en lugar de extractos crudos. Por lo tanto, se recomienda el fraccionamiento y la purificación del extracto de *G. longissima* y *H. cornea* en futuros estudios. Aun así, el uso de extractos algales por parte de la comunidad científica, está tomando una fuerte relevancia debido a los efectos sinérgicos positivos que ocurren entre sus componentes. Este estudio propone a *G. longissima* y *H. cornea* como dos algas rojas muy interesantes pertenecientes a la familia Gracilariaceae, con potentes efectos bioactivos probados en este y en otros estudios con varias líneas celulares.



Capítulo 6

Formulación y elaboración de un producto cosmecéutico con capacidad fotoprotectora y antioxidante a partir del extracto de *Hydropuntia cornea* y otros componentes





Formulación y elaboración de un producto cosmeceútico con capacidad fotoprotectora y antioxidante a partir del extracto de *Hydropuntia cornea* y otros componentes

6

1. Resumen

Por último, en este **Capítulo 6**, se diseñó un producto cosmético con actividad antioxidante y capacidad fotoprotectora empleando extractos acuosos de *H. cornea* a partir de la biomasa producida en el Banco Español de algas (**Capítulo 4**) y otros ingredientes usados en cosmética. La exposición excesiva a la radiación UVA y UVB puede producir efectos negativos a corto plazo (eritema y quemadura solar) y a largo plazo (fotoenvejecimiento prematuro, cáncer de piel e inmunosupresión), en gran parte mediados por las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas en las vías oxidativas. Una de las formas de reducir el riesgo de la UVR es el uso de cremas fotoprotectoras con capacidad antioxidante. En capítulos previos (**Capítulos 1, 2 y 4**) se mostró la alta capacidad antioxidante de los extractos de *H. cornea*. En este capítulo, se determinó la capacidad fotoprotectora mediante el método Colipa (2011) realizado en un simulador solar para cuantificar los siguientes parámetros fotoprotectores: Factor de Protección Solar relacionado con el eritema (FPS) que se trata de una respuesta mediada principalmente por radiación UVB; Factor de Protección de UVA, relacionado con el bronceado persistente expresado como UVA_{FPS} ; y el Factor de Protección frente a efectos biológicos sobre piel, ojos y efectos moleculares en los intervalos espectrales de UVB ($FAPEB_{UVB}$) y UVA ($FAPEB_{UVA}$). Se emplearon diferentes combinaciones de filtros físicos o inorgánicos (TiO_2 y ZnO), filtros químicos u orgánicos (Tinosorb M y S) y filtros biológicos como extractos de *Hydropuntia cornea* o *Ginkgo biloba*, aceite de *Pongamia pinnata* (Karanja) y Vitamina C y E. El extracto concentrado de *H. cornea* mostró un efecto sinérgico con el extracto de *G. biloba* y con el aceite de Karanja rindiendo un FPS de 15, una longitud de onda crítica de 386 nm y un UVA_{FPS} de 4.3; lo que se corresponde al de un fotoprotector ideal (valores mínimos recomendados) frente a UVR. Además, las cremas con extractos biológicos presentaron una actividad antioxidante mucho mayor que las cremas con sólo filtros físicos y/o químicos. La sinergia de los diferentes filtros biológicos puede explicar la absorción de banda ancha en la región de UV dando valores relativamente altos de $FAPEB_{UVB}$ y $FAPEB_{UVA}$. Se discute cómo la aplicación de extractos algales en combinación con otros ingredientes naturales, puede ayudar al diseño de una nueva generación de fotoprotectores contra los efectos negativos de la UVR y también los de la radiación azul e infrarroja, además de las enormes ventajas relacionadas con su alta fotoestabilidad y termoestabilidad además de por no presentar

toxicidad tanto para la salud humana como para el medio ambiente ya que se trata de un producto biodegradable.

2. Material y métodos

2.1. Breve descripción de los componentes empleados

2.1.1. Filtros físicos o filtros inorgánicos

Los óxidos metálicos, como el óxido de titanio (TiO_2) y el óxido de zinc (ZnO) son empleados como fotoprotectores físicos (filtros físicos). Estos protectores solares se describen en la literatura como agentes que reflejan y dispersan la UVR (Wang & Tooley 2011). Los avances tecnológicos en la fabricación han llevado a la disponibilidad de preparaciones microfinas o nanoparticuladas (tamaños entre 20-100 nm) de TiO_2 y ZnO (Popov et al. 2010). Estas nanopartículas absorben/reflejan/dispersan la UVR, y son más transparentes en la piel, reduciendo así cualquier efecto blanqueante (reflectancia de las longitudes de onda más largas de la luz). Recientemente, se demostró que estos componentes atenúan la UVR principalmente por absorción, a diferencia del pensamiento clásico que asumía que se debía a procesos físicos de reflexión. Al ser pequeños cristales de partículas, estos materiales son semiconductores con una gran energía de separación de banda entre la valencia y la banda de conducción (Shaath 2016). El TiO_2 , en particular, tiene un perfil de absorción mayor en UVB, pero se extiende a la longitud de onda UVA. Por otro lado, las partículas de ZnO tienen un perfil plano de absorción que abarca UVB y UVA. Hasta hace poco, el TiO_2 y el ZnO se promocionaban como una alternativa segura a los filtros UVR orgánicos (filtros químicos). Sin embargo, las preocupaciones sobre la penetración potencial de la piel de TiO_2 y ZnO han conducido a una reevaluación de su toxicidad. A raíz de esta preocupación, numerosos estudios han evaluado la penetración dérmica de estos metales (partículas > 100 nm) (Nash 2006), apoyando la tesis de que estos óxidos metálicos no penetran a través de la piel y que su uso en productos cosméticos es seguro (Monteiro-Riviere et al. 2011).

2.1.2. Filtros químicos u orgánicos

La mayoría de los filtros químicos sólo bloquean la región estrecha del espectro UVR. En su mayoría, los filtros químicos utilizados en los fotoprotectores solares son activos en la región UVB. Sólo unos cuantos filtros químicos bloquean la región UVA. La creciente necesidad de filtros de banda ancha y la fotoestabilidad mejorada, ha llevado a la introducción de una nueva generación de filtros, incluyendo metilbenzotiazolil tetrametilbutilfenol (Tinosorb M) y bis-etilhexiloxifenol metoxifenol triazina (Tinosorb S), son moléculas que absorben UVR en un amplio intervalo espectral (UVA y UVB) y de una alta fotoestabilidad que pueden absorber UVB y UVA (Perea 2016). Ambos protegen contra la inducción de la pigmentación y muestran un efecto sinérgico cuando se usan ambas en combinación (Moyal 2004). Tinosorb S es un filtro ultravioleta de amplio espectro, soluble en aceite,

altamente fotoestable, con una buena absorción en la gama de UVA, que se puede utilizar con éxito para mejorar la fotoestabilidad (Chatelain & Gabard 2001) mientras que Tinosorb M consta de partículas orgánicas microfinas que se dispersan en la fase acuosa de la emulsión de filtro solar, combinando así los beneficios de un filtro orgánico con los de un filtro inorgánico. Debido a que las moléculas de Tinosorb presentan un alto peso molecular, es menos probable que sean absorbidas a través de la piel. Los químicos u orgánicos para UVR, se regulan globalmente (Ahmed 2008).

2.1.3. Filtros biológicos

Los filtros biológicos, son aquellos componentes que tienen un origen natural (derivan del metabolismo de un ser vivo) y que tienen la capacidad de actuar como filtro a la UVR (Lawrence et al. 2017). Las algas rojas entre otros, como ya se ha visto largo y tendido en la presente Tesis Doctoral, contienen altos niveles de aminoácidos libres solubles en agua (MAAs) los cuales actúan como fotoprotectores biológicos absorbiendo UVA y UVB (Korbee et al. 2006). Sus máximos de absorción aparecen entre 268 y 362 nm dependiendo de su estructura molecular (Wada et al. 2015). De acuerdo a las investigaciones, el aminoácido Porphyr-334 encontrado en *H. cornea* es el que más potencialidad ofrece a la hora de ser usado como fotoprotector en un producto cosmético debido a sus propiedades fotofísicas y fotoquímicas (Bhatia et al. 2010; Wada et al. 2015). Actualmente, ya existen en el mercado productos cosméticos comerciales que incluyen Porphyr-334 (Helioguard 365®). Se han realizado ensayos *in vivo* usando crema base con 5% de Helioguard 365® (concentración final de MAA de 0.005%) y la misma base con 4% de un protector solar UVB sintético y 1% de un protector solar UVA sintético. Helioguard 365® mejoró la firmeza y la suavidad de la piel así como las arrugas en el área de aplicación del producto tras 4 semanas de uso (Schmid et al. 2006). Helionori® es otro producto que ofrece fotoprotección natural contra las quemaduras solares y que contiene, como ingredientes bioactivos, tres MAAs: Palythine, Porphyr-334 y Shinorine, extraídos del alga roja *Porphyra umbilicalis*. La formulación es resistente a la exposición solar durante 6 h y a 120°C y presenta una estabilidad de 18 meses almacenada a una temperatura de 15-25 °C. La aplicación de una crema con Helionori® al 5% previno efectivamente la aparición de quemaduras en un 94% en comparación con un control. Además, la formulación exhibió un efecto protector eficaz sobre el metabolismo de fibroblastos y queratinocitos expuestos al estrés oxidativo inducido por UVA. Después de 24 h de irradiación en presencia de 2% de Helionori®, la protección de los queratinocitos aumentó en un 57%, y los fibroblastos en un 135%. El producto también proporcionó protección de los componentes celulares contra UVA. La aplicación de 2% de Helionori®, conservaron lípidos de membrana de los queratinocitos en un 139% y los fibroblastos en un 134%, y también ofrecieron la máxima protección para el ADN (Andre et al. 2001).

Además, las macroalgas marinas son una fuente rica de diversos compuestos antioxidantes de naturaleza fenólica. Los compuestos fenólicos, además de ejercer un rol antioxidante, exhiben efectos

inhibidores sobre la metalogénesis, así como proporcionan protección contra el estrés fotooxidativo inducido por la radiación UVB (Rastogi et al. 2017). Los carotenoides también son metabolitos presentes en todas las especies algales con capacidad de contrarrestar los efectos fotooxidativos en la dermis expuesta a la luz por lo que son eficientes en la fotoprotección, eliminando el oxígeno singlete y los radicales peróxido (Sies & Stahl 2004). Además de los filtros biológicos a partir de algas, se proponen otros de origen vegetal, como el aceite de Karanja, el cual procede del árbol *Pongamia pinnata*, de la familia de los guisantes, Fabaceae, nativa de Asia tropical y templada que incluye partes del subcontinente indio, China, Japón, Malasia, Australia y las islas del Pacífico (Sangwan et al. 2010). El aceite de Karanja, posee capacidad fotoprotectora otorgada por el alto contenido en flavonoides entre los que destaca la karanjina (Patil et al. 2015; Novza & Popova 2016), capacidad antioxidante (Obadiah et al. 2012) y presenta una composición de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) del 34% respecto al total (Sarma et al. 2005). El extracto de *G. biloba* comercial, empleado también en la formulación, aporta capacidad antioxidante y fotoprotectora fundamentalmente debido a su alto contenido fenólico (Cefali et al. 2016).

2.1. Formulación y preparación del producto cosmético

Los preparados cosméticos estudiados en este capítulo, se produjeron de acuerdo a la metodología detallada en “Material y métodos generales, Ep. 17”. Se diseñaron ocho combinaciones de productos cosméticos con ingredientes cosméticos comerciales y los nuevos extractos de algas mezclados mediante un emulsionador modelo Unguator 2100 (GAKO International GmbH, Múnich, Alemania). De entre las tres fases (A: oleosa; B: acuosa; C: productos bioactivos) que componen el producto cosmético, cada una de ellas fue homogenizada de forma independiente y a una temperatura concreta en función de su naturaleza química. Con ello, se obtuvieron las combinaciones siguientes: Crema 0: crema base (B) compuesta por los componentes básicos de un cosmético estándar (control +). Todos los preparados cosméticos contienen los componentes básicos (B), más los componentes fotoprotectores (filtros UVR) y antioxidantes (Tabla 6.2). Crema 1: filtros químicos (F_q) compuesta por Tinosorb S y M; Crema 2: filtros Físicos (F_f) compuesta por TiO_2 y ZnO ; Crema 3: filtros Biológicos (F_{b1}) compuesta por aceite de Karanja, y extractos de *H. cornea* y *G. biloba*; Crema 4: filtros químicos más filtros físicos ($F_{q+f} = F_q + F_f$); Crema 5: filtros químicos + filtros biológicos (extracto *H. cornea* + aceite de Karanja) (F_{q+b2}); Crema 6: filtros físicos + filtros biológicos (extracto *H. cornea* + aceite de Karanja) (F_{f+b2}); Crema 7: filtros biológicos (solo *H. cornea*) (F_{He}) y Crema 8: filtros químicos + filtros físicos + filtros biológicos (*H. cornea* + *G. biloba* + aceite de Karanja) (F_{q+f+b1}). Se empleó un simulador solar para determinar los factores de protección solar (Material y métodos generales. Ep. 19).

Cabe destacar que los filtros químicos no están permitidos en la cosmética natural (Cervellon et al. 2011). Si se acepta el uso de filtros físicos o minerales como el TiO_2 y ZnO hasta un 25%. Los demás preparados, al poseer un 95% de sus ingredientes de origen natural, es decir, vegetales, animales o minerales sin modificaciones fisicoquímicas autorizadas, son considerados “cosméticos naturales”. Hasta un 5% de sus ingredientes en cuanto a la composición total del cosmético, pueden ser ingredientes de síntesis autorizados (Cervellon et al. 2011). Este **Capítulo 6** de la presente Tesis Doctoral, pretende comparar diferentes combinaciones cosméticas para los parámetros fotoprotectores y antioxidantes, dentro del marco de la cosmética natural. Todos los ingredientes cosméticos empleados en la elaboración de los productos, fueron obtenidos comercialmente, excepto del extracto de *H. cornea*, el cual fue obtenido por rotavaporación a partir de biomasa procedente del BEA durante la realización del experimento del **Capítulo 4** de la presente Tesis Doctoral.

3. Resultados

3.1. Preparación y estudio preliminar del extracto de *Hydropuntia cornea*

3.1.1. Optimización de la temperatura de extracción

Previo elaboración del producto cosmético, se preparó, mediante rotavaporación y de acuerdo a la metodología descrita en el **Capítulo 1** de esta presente Tesis Doctoral, un extracto acuoso de *H. cornea* a la temperatura de 50 °C a fin de preservar, lo máximo posible, los compuestos bioactivos de interés (antioxidantes totales y compuestos fenólicos) (Figura 6.1). La rotavaporación permitió concentrar el extracto de *H. cornea* 12.5 veces preservando la integridad molecular. Los aminoácidos tipo micosporina (MAAs), no se tuvieron en cuenta en este estudio de temperatura óptima de extracción, debido a la alta termoestabilidad que presentan (Zhang et al. 2004; Yuan & Athukorala 2011), ya que en ningún caso, esta temperatura iba a ser superada.

Se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) para las diferentes temperaturas de extracción ensayadas, tanto para la capacidad antioxidante como para el contenido en compuestos fenólicos encontrando los valores más altos de antioxidantes para las temperaturas comprendidas entre 25-40 °C y el mayor contenido fenólico en 55 °C.

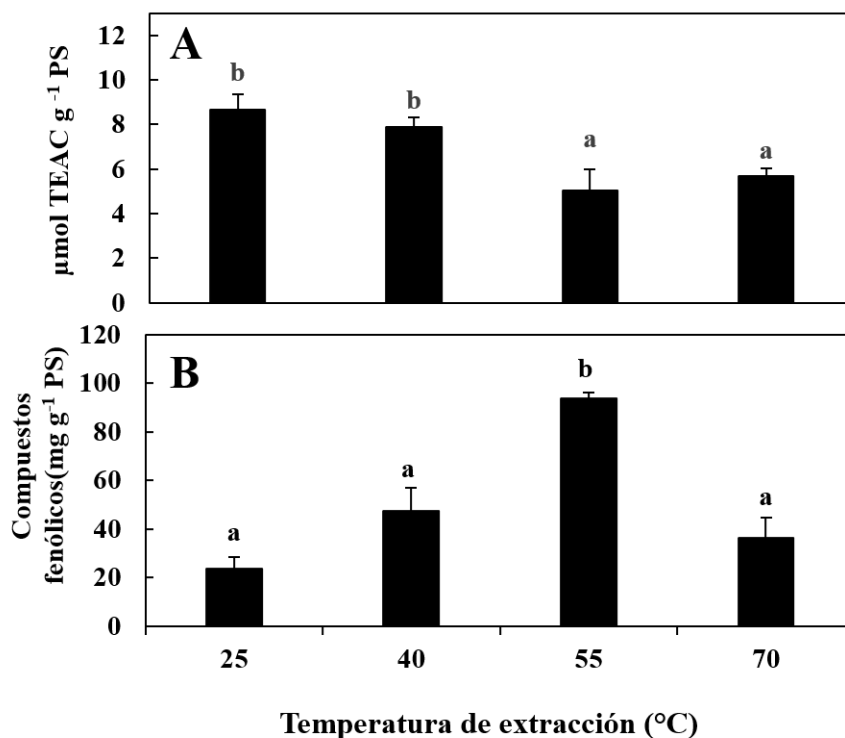


Figura 6.1. Temperaturas de extracción para el contenido de antioxidantes totales ($\mu\text{mol TEAC g}^{-1} \text{PS}$) (A) y compuestos fenólicos ($\text{mg g}^{-1} \text{PS}$) (B). Diferentes letras indican diferencias significativas en el análisis post-hoc (SNK) para el análisis ANOVA de una vía. ($n = 3$).

3.1.2. Evaluación de la capacidad fotoprotectora del extracto crudo de *H. cornea*

Fijada la temperatura de extracción (50 °C) y obtenidos los extractos y previa inclusión en el preparado cosmético, se procedió a evaluar la capacidad fotoprotectora del extracto crudo de forma aislada mediante ensayos en el simulador solar mediante el método Colipa 2011. Para ello se estudiaron 5 concentraciones diferentes de extracto por unidad de área ($1.1\text{-}13.9 \text{ mg PS de } H. \text{ cornea cm}^{-2}$) aplicadas sobre las placas PMMA (polimetilmetacrilato) de acuerdo al método Colipa 2011. (Figura 6.2).

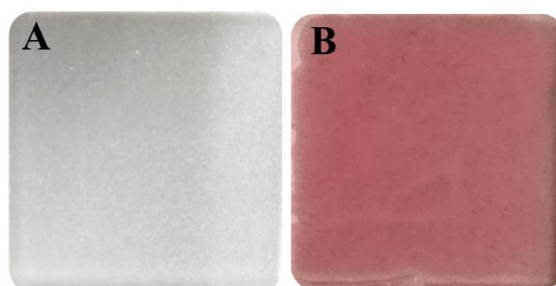


Figura 6.2. Placas PMMA sin extracto (A) y con extracto de *H. cornea* ($8.6 \text{ mg PS de } H. \text{ cornea cm}^{-2}$)

Posterior a la evaluación de la capacidad fotoprotectora, se observó un aumento exponencial significativo ($p < 0.05$) del FPS y del UVA_{FPS} ($R^2 = 0.99$ y 0.91 respectivamente). Para el FPS, todas las concentraciones arrojaron valores significativamente diferentes, sin embargo, para el UVA_{FPS} , las concentraciones de 2.1 y 4.3 mg PS de *H. cornea* cm^{-2} fueron iguales estadísticamente (Figura 6.3). El ratio FPS/ UVA_{FPS} fue de 9.4 ± 1.4 y la longitud de onda crítica (λ crítica) fue de 378.5 ± 1.8 .

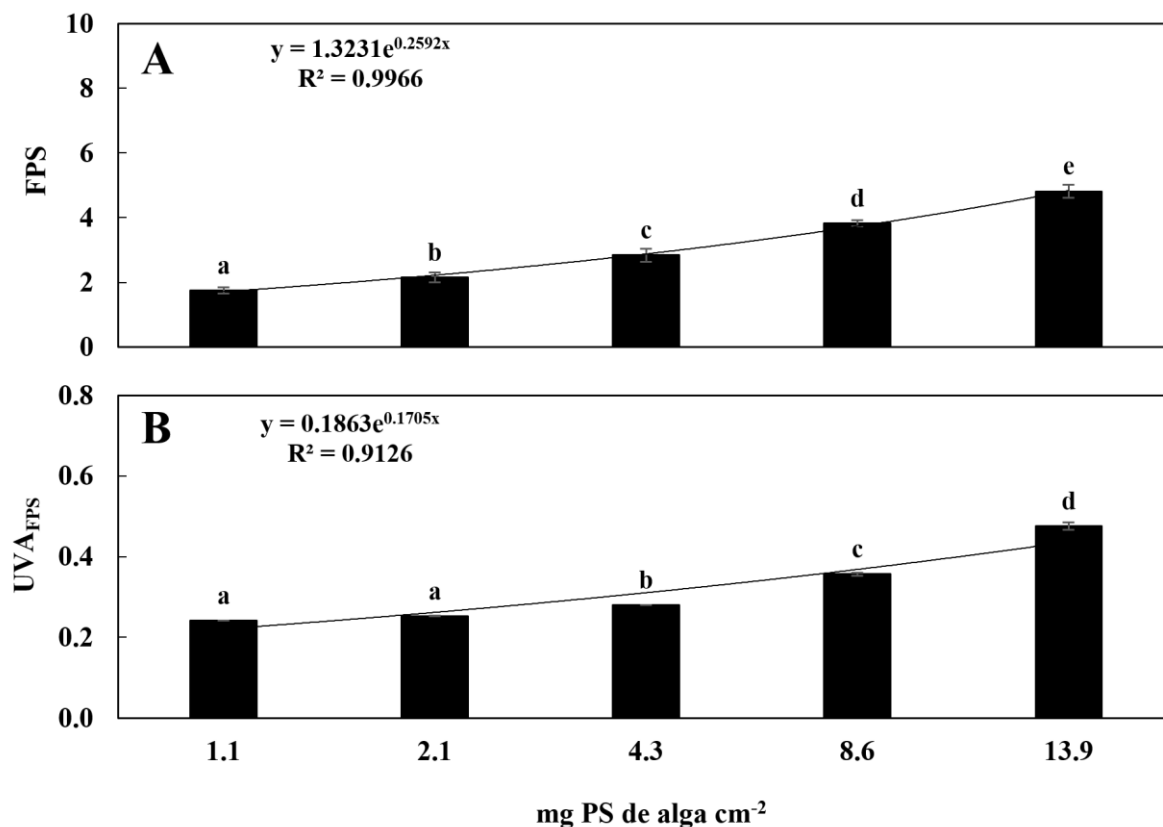


Figura 6.3. Estudio de la capacidad fotoprotectora para los extractos rotavaporados de *H. cornea*. FPS (290-400 nm) (A) y UVA_{FPS} (290-320 nm) (B). Las letras sobre las barras de histograma corresponde a diferencias significativas entre la concentración estudiada en un análisis post-hoc (SNK) para una ANOVA de una vía.

Las propiedades ópticas del extracto, evaluado de acuerdo al método Colipa 2011, presentaron diferente porcentaje de absorción de la irradiancia espectral procedente de la fuente de luz (simulador solar) del $80.1\% \pm 1.9$ de UVB (280-320 nm), $86.0\% \pm 1.4$ de UVA-II (320-340 nm), $56.3\% \pm 3.1$ de UVA-I (340-400 nm), $43.6\% \pm 3.7$ de Azul (400-460 nm) y del $45.4\% \pm 3.7$ de PAR (400-700 nm) (Figura 6.4).

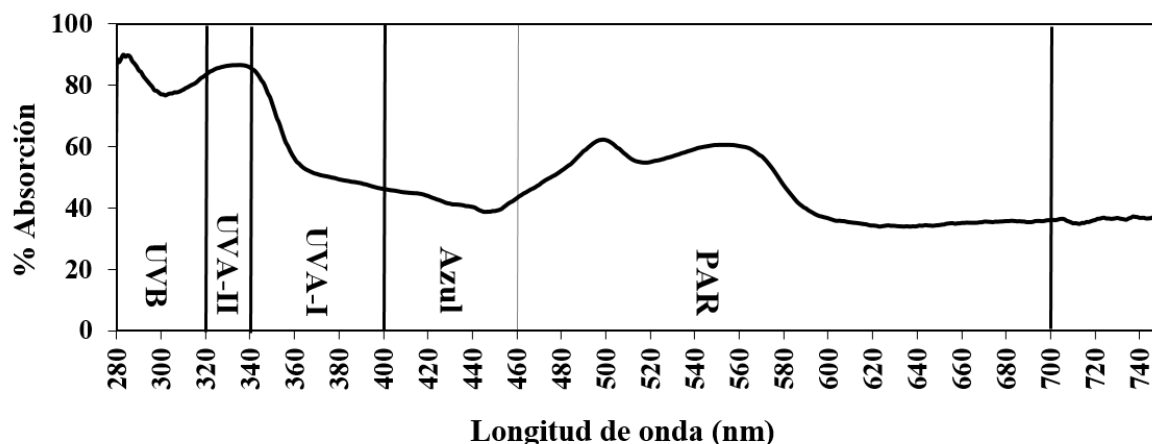


Figura 6.4. Espectro de absorción (%) del extracto crudo de *H. cornea* respecto a la fuente lumínica (simulador solar) empleado en la elaboración de los preparados cosméticos. 1.3 mL de extracto corresponde a 13.9 mg de PS de *H. cornea*.

3.2. Evaluación de la fotoprotección de productos fotoprotectores comerciales

Previa evaluación de los productos cosméticos elaborados, se evaluó, a modo de control positivo, cuatro fotoprotectores cosméticos comerciales: Isdin® (50 FPS), Heliocare® 360 (+50 FPS), Eucerin® (50 FPS) y Rapaskin (+50 FPS). Los productos fotoprotectores comerciales, absorbieron el $98.4\% \pm 0.3$ de UVB (280-320 nm), $97.9\% \pm 0.3$ de UVA-II (320-340 nm), 92.6 ± 0.6 de UVA-I (340-400 nm), 53.4 ± 1.3 de Azul (400-460 nm) y del 50.1 ± 0.9 de PAR (400-700 nm) en base al promedio de los cuatro productos analizados (Tabla 6.1). Los valores promedio de FPS fueron de 55 ± 8.4 . Para la longitud de onda crítica (λ_c), los valores promedio fueron de 381 ± 1.4 . Todos los parámetros fotoprotectores evaluados concordaron, en cuanto a sus valores, con los descritos por los fabricantes, lo cual refuerza y verifica la metodología empleada para los análisis de los productos cosméticos elaborados. Los productos cosméticos comerciales mostraron mejores valores de absorción que los parámetros ideales propuestos por la literatura científica. La absorción promedio para los productos comerciales fue de 98.4 ± 0.3 para UVB, 97.9 ± 0.4 para UVA-II, 92.6 ± 1.4 para UVA-I y 86.1 ± 2.2 para UVA-I (1/T). La dosis acumulativa de quemaduras visibles (ASD %), fue 3.8 veces mejor que el ideal.

Tabla 6.1. Productos cosméticos comerciales para la evaluación de los parámetros ópticos: A (%) UVB/UVA-II, A (%) UVA-I / Azul y ASD (%) y los parámetros fotoprotectores: FPS (290-400 nm), longitud de onda crítica (λ_c : nm), UVA_{FPS} (320-400 nm) y ratio FPS/UVA_{FPS} mediante el método *in vitro* COLIPA 2011.

Parámetro fotoprotector	Producto cosmético comercial			
	Heliocare 360® (+50 FPS)	Isdin® (50 FPS)	Eucerin® (50 FPS)	Rapaskin® (50 FPS)
A (%) UVB / UVA-II	98.8 / 98.2	98.3 / 98.3	98.4 / 97.4	98.1 / 97.7
A (%) UVA-I / Azul	57.1 / 90.7	94 / 51.2	93.3 / 51.4	92.3 / 54
A (%) PAR	52.30	49.12	48.45	50.53
ASD (%)	1.50	2.01	1.79	2.08
FPS	67 ± 1.9	50 ± 1.3	56 ± 1.1	48.5 ± 2.1
λ_c	378.9 ± 0	381.9 ± 0	381.8 ± 0.1	381.2 ± 0.1
UVA _{FPS}	30.7 ± 0.9	31.1 ± 0.9	25.7 ± 0.9	32.2 ± 2.3
FPS/UVA _{FPS}	2.2 ± 0.5	1 ± 0.5	2.2 ± 0.1	1.5 ± 0

ASD (%): porcentaje acumulación de quemaduras visibles relativizado a los 10 min. (FPS 1 = 100 % ASD).

¹B: crema base sin ingredientes potencialmente fotoprotectores (control negativo).

3.3. Evaluación de la capacidad fotoprotectora de los preparados cosméticos

Los preparados cosméticos elaborados (Figura 6.5), mostraron propiedades organolépticas neutrales, ya que ningún aromatizante fue añadido en la formulación. Todos los preparados mostraron gran penetrabilidad dérmica, buena humectación y buena textura al tacto. El color de cada uno varió en función de los ingredientes de las diferentes combinaciones (Tabla 6.2).

Tabla 6.2. Fases, temperatura de homogenización e ingredientes para la elaboración de los productos cosméticos

			%	Nomenclatura de los productos cosméticos							
				0	1	2	3	4	5	6	7
Fases	Tª Homogenización	Ingrediente	B	F _q	F _f	F _{b1}	F _{q+f}	F _{q+b2}	F _{f+b2}	F _{Hc}	F _t
A	70°C	Olivem 1000	8	8	8	8	8	8	8	8	8
		TiO ₂	-	-	5	-	5	-	5	-	5
		ZnO	-	-	5	-	5	-	5	-	5
		Tinosorb S	-	5	-	-	5	5	-	-	5
		Vit C (palmitato de ascorbilo)	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		Vit E (alfa tocoferol acetato)	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		Aceite de karanja	-	-	-	15	-	15	15	-	15
		Aceite de jojoba	15	15	15	-	15	-	-	15	-
Total			25	30	35	25	40	30	35	25	40
B	50/70°C	H ₂ O _d	74	64	64	54	54	49	49	59	34
		Tinosorb M	-	5	-	-	5	5	-	-	5
		Total	74	69	64	54	59	54	49	59	39
C	< 40°C	Sharomix 705	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
		Extracto <i>Hydropuntia cornea</i>	-	-	-	15	-	15	15	15	15
		Extracto <i>Ginko biloba</i>	-	-	-	5	-	-	-	-	5
Total % (A, B y C)			100	100	100	100	100	100	100	100	100

Los productos que contenían filtros físicos (TiO₂ y ZnO), otorgaron a los un color blanco. Por otro lado, el aceite de Karanja concedió un color “anaranjado” a los productos (3,5 y 6). Por último, el extracto concentrado de *H. cornea*, confirió un color “rosado” a la formulación (7). Este color es debido al alto contenido en ficobiliproteínas. El pH de los preparados cosméticos presentó un valor promedio de 5.6 ± 0.2 , el cual está dentro del intervalo de pH normal para la piel humana (Darlenski & Fluhr 2017).

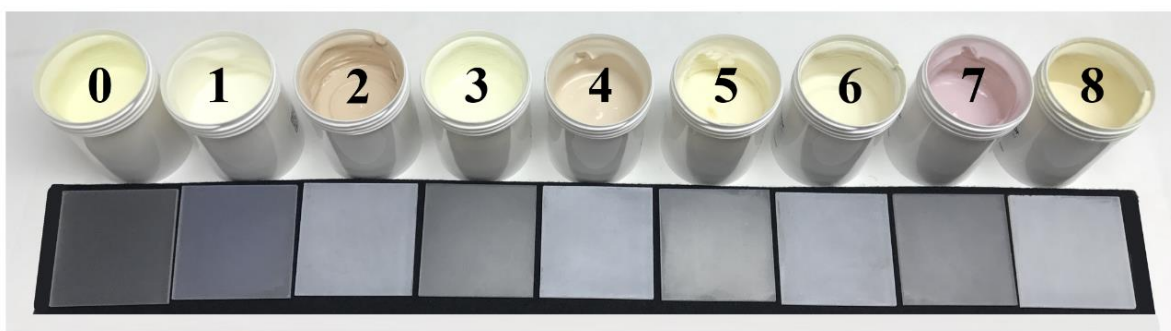


Figura 6.5. Preparados cosméticos elaborados (0-8) de acuerdo a las combinaciones detalladas en la Tabla 6.2 y su aplicación sobre las placas PMMA para posterior evaluación de la capacidad fotoprotectora en el simulador solar. El control negativo, es la crema 0 donde no hay ningún agente fotoprotector en su composición

Los productos comerciales empleados como control, mostraron valores de transmisión de acuerdo a los ideales. Sin embargo, el extracto concentrado de *H. cornea*, presentó valores de

transmisión más lejanos a los ideales. Los productos elaborados más próximos a los ideales fueron aquellos que contenían filtros químicos (F_q), filtros Biológicos (F_{b1}) compuesta por aceite de Karanja, extracto de *Hydropuntia cornea* y extracto de *Ginko biloba*.

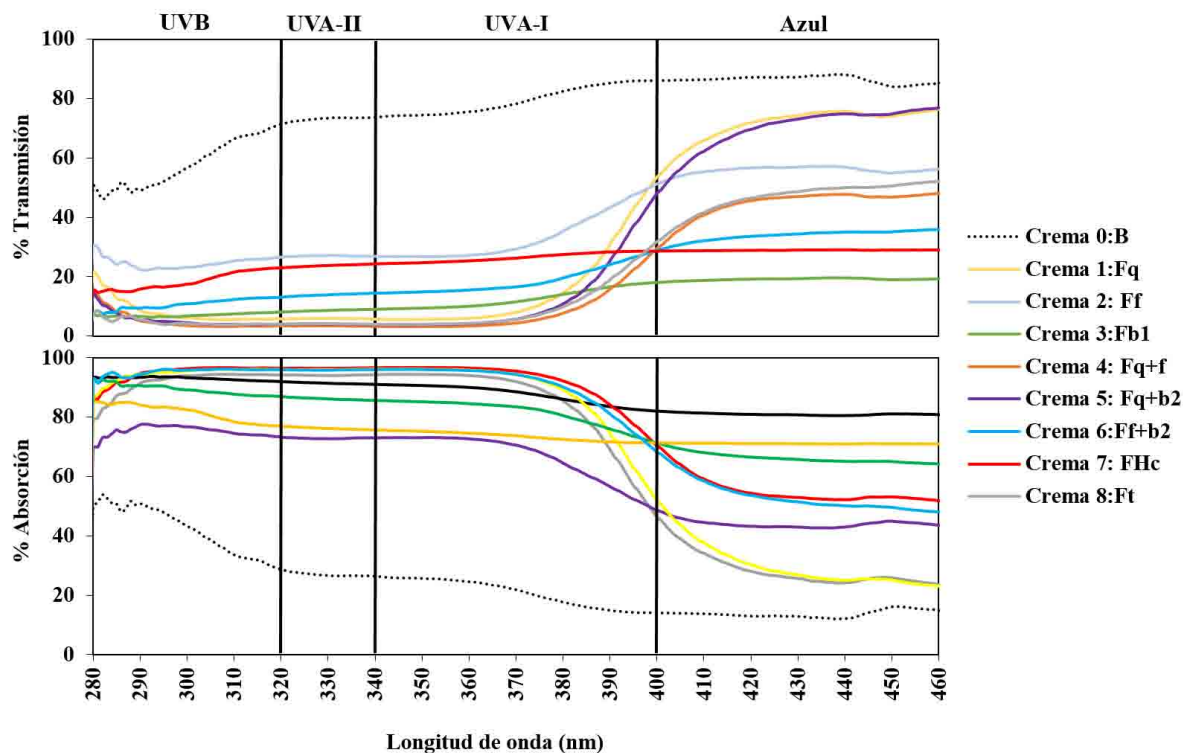


Figura 6.6. Espectros de transmisión % (A) y de absorción % (B) para los productos cosméticos elaborados. Crema 0: crema base (**B**) compuesta por los componentes básicos de un cosmético estándar (control +); Crema 1: filtros químicos (F_q) compuesta por Tinosorb S y M; Crema 2: filtros Físicos (F_f) compuesta por TiO_2 y ZnO ; Crema 3: filtros Biológicos (F_{b1}) compuesta por aceite de Karanja, y extractos de *H. cornea* y *G. biloba*; Crema 4: filtros químicos más filtros físicos ($F_{q+f} = F_q + F_f$); Crema 5: filtros químicos + filtros biológicos (extracto *H. cornea* + aceite de Karanja) (F_{q+b2}), Crema 6: filtros físicos + filtros biológicos (extracto *H. cornea* + aceite de Karanja) (F_{f+b2}); Crema 7: filtros biológicos (solo *H. cornea*) (F_{Hc}) y Crema 8: filtros químicos + filtros físicos + filtros biológicos (*H. cornea* + *G. biloba* + aceite de Karanja) ($F_t = F_{q+f+b1}$).

Respecto a los productos elaborados en este estudio, se observaron diferencias significativas entre ellos ($p < 0.05$). Los productos que contenían filtros químicos (F_q) fueron los más próximos al perfil ideal, aunque estos valores mejoraron a medida en que se fueron combinando los diferentes filtros químicos, físicos y biológicos. El producto cosmético que contenía exclusivamente el extracto de *H. cornea*, redujo en un 43% la transmisión de UVB, en un 43% la de UVA-II, en un 52% la de UVA-I y en un 54 % el ASD (%), respecto al producto base, el cual no contiene sustancia fotoprotectora alguna (B) (Tabla 6.3). Estos valores, se vieron mejorados cuando se añadieron filtros químicos y

físicos. La mejor combinación posible, en cuanto a la mejora de la capacidad óptica, fue el producto que contenía todos los componentes de naturaleza fotoprotectora (F_t).

Tabla 6.3. Parámetros ópticos. T (%) UVB/UVA-II, T (%) UVA-I / Azul y ASD (%) obtenidos mediante el método *in vitro* COLIPA 2011 para el extracto concentrado de *H. cornea* (13.9 mg PS cm⁻²) y para los preparados cosméticos (Cremas 0-8).

Producto cosmético	T (%) UVB / UVA-II	T (%) UVA-I / Azul	ASD %
<i>H. cornea</i>	19.9 / 14	43.7 / 56.4	21
Crema 0: ¹B	63.7 / 73	79.4 / 86.3	57
Crema 1: F_q	6.2 / 5.9	15.7 / 68.4	7
Crema 2: F_f	25 / 27	33.6 / 55.5	23
Crema 3: F_{b1}	7.4 / 8.7	12.6 / 18.9	7
Crema 4: F_{q+f}	3.7 / 3.4	8.3 / 42.3	4
Crema 5: F_{q+b2}	4.3 / 4	12.5 / 65.8	5
Crema 6: F_{f+b2}	11.9 / 13.9	18.7 / 32.8	11
Crema 7: F_{Hc}	20.5 / 23.8	26.5 / 28.8	18
Crema 8: F_t	4.1 / 4.1	10 / 43.9	4
*VMR	6.7 / 6.7	6.7 / n.f.	7

*Valores mínimos recomendados para los parámetros fotoprotectores de acuerdo a Osterwalder et al. (2014). ASD (%): porcentaje de acumulación de quemaduras visibles relativizado a los 10 min. (FPS 1 = 100 % ASD). ¹B: crema base sin ingredientes potencialmente fotoprotectores (control negativo). n.f.: valor no definido por la literatura científica.

En relación al FPS, el parámetro fotoprotector de más relevancia en los productos cosméticos fotoprotectores, en la Tabla 6.4 se observó lo siguiente:

- Crema 0: crema base, sin adición de ningún componente potencialmente fotoprotector.
- Crema 1: filtros químicos (F_q) alcanza un FPS de 15, similar a la crema 3 (F_{b1}) y mayor que la crema 2 (F_f).
- Crema 2: filtros físicos (F_f) alcanza a FPS de 4 mucho menor que con F_q o F_b .
- Crema 3 filtros Biológicos (aceite de Karanja y extracto de *H. cornea* y extracto de *G. biloba*) (F_{b1}), presenta FPS de 14 similar al F_q y mayor que F_f .
- Crema 4: filtros químicos + filtros físicos (F_{q+f}), alcanza FPS altos de 25, mayor como era de esperar que cada filtro por separado.
- Crema 5: filtros químicos + filtros biológicos (F_{q+b2}), llega a FPS altos de 22, algo menor que en la mezcla de filtros químicos y físicos ($F_q + F_f$).
- Crema 6: filtros físicos + filtros biológicos (F_{f+b2}) llega solo a FPS de 9 menor algo mayor que sólo F_f pero mucho menor que solo F_b *, pudiendo existir alguna interferencia entre los filtros físicos y biológicos.
- Crema 7: filtro biológico sólo con extracto de *Hydropuntia* (F_{Hc}), alcanza valores de FPS de 6, bastante más bajo que el F_{b1} que contenía también aceite de Karanja y extracto de *G. biloba*.

- Crema 8: filtros químicos + filtros físicos + filtros biológicos- F_{b1} (F_t), como era de esperar al contar con los tres tipos de filtros, alcanza un FPS de 25 pero no mejora a la crema 4 (F_{q+f}). De nuevo se observa interferencia entre F_f y F_{b1} en relación al FPS.

Tabla 6.4. Parámetros fotoprotectores FPS (290-400 nm), longitud de onda crítica (λ_c : nm), UVA_{FPS} (320-400 nm) y ratio FPS/ UVA_{FPS} mediante el método *in vitro* COLIPA 2011, para el extracto concentrado de *H. cornea* (13.9 mg PS cm^{-2}) y para los preparados cosméticos (Cremas 0-8).

Producto cosmético	FPS	λ_c	UVA_{FPS}	FPS/ UVA_{FPS}
<i>H. cornea</i>	4.8	376.9	0.5	10.1
Crema 0: 1B	1.8 ^c	378.3 ^a	0.4 ^a	4.2 ^{ab}
Crema 1: F_q	15.2 ^a	380.2 ^b	3.4 ^b	4.4 ^{ab}
Crema 2: F_f	4.2 ^d	383.1 ^f	0.7 ^a	6.5 ^{ab}
Crema 3: F_{b1}	14.5 ^a	384.5 ^h	4.3 ^b	3.4 ^b
Crema 4: F_{q+f}	25.3 ^b	382.2 ^e	23.2 ^e	1.1 ^a
Crema 5: F_{q+b2}	21.6 ^g	380.4 ^c	6.9 ^c	3.1 ^a
Crema 6: F_{f+b2}	9.3 ^f	384.2 ^g	1.6 ^a	5.8 ^{ab}
Crema 7: F_{Hc}	5.5 ^e	386.3 ⁱ	0.8 ^a	6.7 ^{ab}
Crema 8: F_t	24.9 ^b	381.7 ^d	15.3 ^d	1.7 ^c
VMR	15	389	5	3

*Valores mínimos recomendados para los parámetros fotoprotectores de acuerdo a Osterwalder et al. (2014).

¹B: producto base sin ingredientes potencialmente fotoprotectores (control negativo).

Respecto a la longitud de onda crítica (λ_c), muchos de los preparados cosméticos mostraron mejores valores incluso que los productos comerciales. Estadísticamente, cada productos cosmético mostró valores diferentes en cuanto a este valor ($p < 0.05$). El valor ideal para este parámetro se establece en 389 nm, el valor promedio para los productos comerciales fue de 381 nm. Todas las combinaciones de preparados cosméticos en este estudio superaron o estuvieron muy próximos a los valores promedio comerciales, excepto la crema base como era de esperar. El resultado más interesante para este parámetro, fue el hallado en el filtro biológicos (crema 7: F_{Hc}), el cual solo contenía extracto de *H. cornea* y en el que se alcanzó una longitud de onda crítica de 389 nm.

El Factor de protección frente a UVA (UVA_{FPS}) alcanza valores más altos en la crema 4 (F_{q+f}) y en la crema 8 (F_t) como cabría esperar. El tercer valor más alto lo alcanzó la crema 5 (F_{q+b2}) (6.9) el cual se aproxima más al valor ideal de 5 (1/3 del FPS). El preparado cosmético con extracto de *H. cornea* exclusivamente, resultó 6 veces menor que el ideal (0.8 respecto a 5) (Tabla 6.4).

La capacidad antioxidante solo se evaluó en los preparados cosméticos los cuales presentan componentes con capacidad antioxidante demostrada. Los preparados cosméticos que más capacidad antioxidante mostraron, fueron la crema 3 (F_{b1}), la cual contenía extracto de *H. cornea*, extracto de *G. biloba* y aceite de Karanja con valores de 10.8 μmol TEAC g^{-1} de producto cosmético. La crema 7 solo con extracto de *H. cornea* presentó actividad similar a la crema 3 con los tres filtros (Aceite de Karanja

y extracto de *G. biloba*) por lo que hay que concluir que la actividad antioxidante la aporta el extracto de *H. cornea*. Como era de esperar, la crema 8 (combinación de todos los filtros y componentes bioactivos), con valores de $15.5 \mu\text{mol TEAC g}^{-1}$ de producto cosmético (Figura 6.7). En los demás productos no se hallaron diferencias significativas en cuanto a la capacidad antioxidante. Cabe destacar que todos los productos cosméticos elaborados contenían un 1% de Vitamina C y un 1% de Vitamina E, lo cual ya aporta cierta actividad antioxidante basal para preservar la integridad del producto cosmético por un periodo de tiempo.

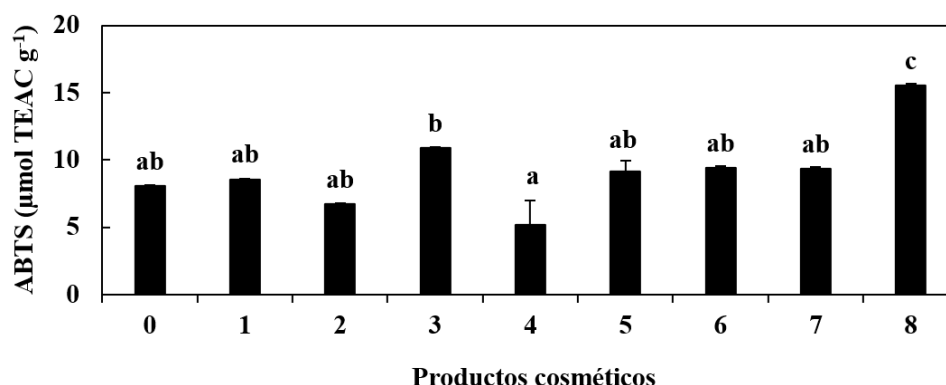


Figura 6.7. Capacidad antioxidante de los productos cosméticos elaborados, expresados como $\mu\text{mol TEAC g}^{-1}$ de producto cosmético. Crema 0: crema base (**B**) compuesta por los componentes básicos de un cosmético estándar (control +); Crema 1: filtros químicos (F_q) compuesta por Tinosorb S y M; Crema 2: filtros Físicos (F_f) compuesta por TiO_2 y ZnO ; Crema 3: filtros Biológicos (F_{b1}) compuesta por aceite de Karanja, y extractos de *H. cornea* y *G. biloba*; Crema 4: filtros químicos más filtros físicos ($F_{q+f} = F_q + F_f$); Crema 5: filtros químicos + filtros biológicos (extracto *H. cornea* + aceite de Karanja) (F_{q+b2}); Crema 6: filtros físicos + filtros biológicos (extracto *H. cornea* + aceite de Karanja) (F_{f+b2}); Crema 7: filtros biológicos (solo *H. cornea*) (F_{hc}) y Crema 8: filtros químicos + filtros físicos + filtros biológicos (*H. cornea* + *G. biloba* + aceite de Karanja) ($F_t = F_{q+f+b1}$).

Los resultados para el parámetro FAPEB, son calculados a partir de las mismas medidas espectrales que hicieron para el FPS y UVA_{FPS} y siguiendo los mismos procedimientos matemáticos para su calculo de acuerdo a las directrices que dicta el método Europeo Colipa 2011. Con la finalidad de simplificar y aunar todos los factores de protección frente a los 15 efectos biológicos (para piel, ojos y a nivel molecular), se expresaron los valores como promedio de $\text{FAPEB}_{\text{UVB}}$ y $\text{FAPEB}_{\text{UVA}}$. Así pues, se obtuvieron valores más altos en los preparados cosméticos, tanto para el $\text{FAPEB}_{\text{UVB}}$ como para el $\text{FAPEB}_{\text{UVA}}$ en los tres compartimentos (promedio). El extracto crudo de *H. cornea* mostró unos mejorados resultados si se comparan con la crema base (0), incrementando 2.8 veces más el $\text{FAPEB}_{\text{UVB}}$ y 2.7 veces el $\text{FAPEB}_{\text{UVA}}$. Respecto a los preparados cosméticos, los filtros químicos (F_q) aumentaron 8 veces el $\text{FAPEB}_{\text{UVB}}$ respecto a la crema base y 10 veces el $\text{FAPEB}_{\text{UVA}}$. Sin embargo, los filtros físicos (F_f), solo aumentaron en 2.4 y 2.6 veces para $\text{FAPEB}_{\text{UVB}}$ y $\text{FAPEB}_{\text{UVA}}$ respectivamente. La

combinación entre ambos si resultó en una sinergia positiva en los filtros físicos y químicos aumentando mucho más los valores del FAPEB (14 y 18 veces para $\text{FAPEB}_{\text{UVB}}$ y $\text{FAPEB}_{\text{UVA}}$ respectivamente). Los filtros biológicos F_{b1} (extracto de *H. cornea*, extracto de *G. biloba* y aceite de Karanja), también incrementan considerablemente el FAPEB (8 veces el $\text{FAPEB}_{\text{UVB}}$ y 7.6 veces el $\text{FAPEB}_{\text{UVA}}$). Si se compara con el producto cosmético que solo contenía extracto de *H. cornea* (F_{Hc}), se observa que la adición de aceite de Karanja en el producto supone un incremento del 62% en $\text{FAPEB}_{\text{UVB}}$ y del 59% para $\text{FAPEB}_{\text{UVA}}$. Extrañamente, para el producto cosmético que contenía todos los filtros físicos, químicos y biológicos (F_t), se observaron que los mayores valores de FAPEB que los de los productos que contenían filtros físicos (F_f), químicos (F_q) o biológicos (F_{b1}) por separado, pero aun así, fueron menores que para la combinación de filtros químicos y físicos (F_{q+f}) (Tabla 6.5). Los parámetros FPS y FAPEB se correlacionaron positivamente tanto para $\text{FAPEB}_{\text{UVB}}$ ($p < 0.01$; $r = 0.99$), como para $\text{FAPEB}_{\text{UVA}}$ ($p < 0.01$; $r = 0.96$) (Ver “Material Suplementario, Figura S.6.1 y Tabla S.6.1).

Tabla 6.5. Factor de protección solar de efectos biológicos (FAPEB). Se muestran los valores promedio para los 15 efectos biológicos de UVB (11 espectros de acción) y de UVA (4 espectros de acción) para el extracto concentrado de *H. cornea* (13.9 mg PS cm^{-2}) y para los preparados cosméticos (Cremas 0-8).

Producto cosmético	$\text{FAPEB}_{\text{UVB}}$	$\text{FAPEB}_{\text{UVA}}$	$\text{FAPEB}_{\text{UVB}} / \text{FPS}$	$\text{FAPEB}_{\text{UVA}} / \text{UVA}_{\text{FPS}}$
Heliocare 360	69.3	31.8	1.03	1.0
Isdin Gel Cream 50FPS	53.9	44.3	1.08	1.4
Eucerin 50 FPS	57.1	31.4	1.02	1.2
Rapaskin 50	50.1	30.7	1.03	1.0
<i>H. cornea</i>	4.7	3.5	0.98	7.4
Crema 0: ¹B	1.7 ^a	1.3 ^c	0.96	3.2
Crema 1: F_q	14.6 ^f	13.5 ^f	0.96	3.9
Crema 2: F_f	4.1 ^b	3.5 ^a	0.96	5.4
Crema 3: F_{b1}	13.7 ^e	9.9 ^e	0.94	2.3
Crema 4: F_{q+f}	25 ⁱ	24 ^g	0.99	1.0
Crema 5: F_{q+b2}	20.7 ^g	18.9 ^b	0.96	2.8
Crema 6: F_{f+b2}	8.8 ^d	6.5 ^d	0.95	4.1
Crema 7: F_{Hc}	5.2 ^c	4 ^a	0.95	4.9
Crema 8: F_t	22.4 ^h	19.6 ^b	0.90	1.3

¹B: producto base sin ingredientes potencialmente fotoprotectores (control negativo).

4. Discusión

En este estudio, primeramente se optimizó la eficiencia de extracción de los compuestos bioactivos de *H. cornea* para su posterior uso en un producto cosmético. La extracción de estos compuestos está influenciada por múltiples parámetros como son la temperatura, el tiempo y la polaridad del solvente empleado, entre otros, y su efectos pueden ser independientes o interactivos

(Montgomery 2001). Un factor a tener en cuenta para realizar la extracción de la forma más eficiente posible, manteniendo la integridad molecular, es la temperatura. Yuan & Walsh (2006) afirman que entre 20-50° C, no existe degradación térmica de antioxidantes. En nuestro caso, *H. cornea* no resultó afectada por las altas temperaturas. Para la obtención de compuestos fenólicos, las temperaturas de extracción se encuentran fijadas en un intervalo de entre 15-95°C (Liyana-Pathirana & Shahidi 2005). En este estudio, se muestra el máximo de extracción de estas moléculas a 55° C, mientras que a temperaturas mayores, se obtienen valores próximos a los encontrados a bajas temperaturas.

De acuerdo a Liazid et al. (2007), existe una clara relación entre la estructura química y la estabilidad de los compuestos bioactivos que se estudian bajo diferentes condiciones de extracción. Además, se ha demostrado que aquellos que tienen un mayor número de sustituyentes de tipo hidroxilo se degradan más fácilmente bajo estas condiciones de temperatura (Sutivisedsak et al. 2010). Normalmente, la eficiencia de extracción aumenta a mayores temperaturas de extracción, pero la temperatura afecta a la estabilidad de los compuestos los cuales dependen estrechamente de su estructura (Garcia-Salas et al. 2010). El oxígeno molecular (O₂), también es un factor clave en la degradación de componentes durante la extracción, pero esto es evitado en este estudio mediante el proceso de rotavaporación, el cual permite realizar esta fase en condiciones de vacío (Lorenz et al. 2008).

El mercado actual en el ámbito cosmético, se ha visto incrementado durante la última década (Renner et al. 2017). En los últimos años, la mayoría de las empresas cosméticas han lanzado productos cosmeceúticos los cuales contienen fotoprotectores solares, cremas hidratantes, antioxidantes o una combinación de los tres y que aportan, además, ingredientes bioactivos capaces de mejorar las funciones celulares relacionadas con la defensa antioxidante (Mufti 2003, Baran & Maibach 2017, Jahan et al. 2017). El extracto de *H. cornea* (13.9 mg de PS de alga cm⁻²) evaluado de forma independiente sin estar vehiculizado en ningún preparado cosmético, presentó una alta capacidad de absorción de UVR: 80% de UVB, 86% de UVA-II y 56% de UVA-I. Esta alta absorción debe estar asociada a su contenido en moléculas fotoprotectoras: MAAs totales (hasta 5 ± 1.8 mg MAAs g⁻¹ PS) (**Capítulos 1, 2 y 4**), al contenido en ficobiliproteínas (ficocianinas + ficoeritrinas) las cuales otorgan al extracto el “color rosado” (hasta 1.2 mg FC g⁻¹ PS y 5.3 mg FE g⁻¹ PS), además del contenido fenólico (hasta 95 ± 26 mg de compuestos fenólicos g⁻¹ PS).

La UVR se asocia con una variedad de efectos negativos para la salud. Pueden utilizarse múltiples métodos fotoprotectores en cuanto a la adición de moléculas fotoprotectoras, para proporcionar protección contra la exposición nociva. Las barreras físicas, como ropa y gafas de sol, pueden servir como una forma eficaz de proteger los efectos sobre la piel y los ojos, respectivamente. Los filtros solares tópicos que filtran el espectro UVB y UVA también están disponibles para optimizar

la protección tanto en productos cosméticos, como en gafas o en prendas de vestir (Gambichler et al. 2016; Hsu & Chauhan 2016; Young et al. 2017). En comparación con las antiguas generaciones de protectores solares, los productos elaborados en este estudio, ofrecen una protección más equilibrada contra los rayos UVB y los rayos UVA, aunque actualmente todavía se necesitan importantes avances para mejorar la protección contra los rayos UVA. El paso inminente para la nueva generación sobre pruebas y etiquetado de protección UVA tienen el potencial de estimular la industria de protección solar para producir mejores productos (Ryu et al. 2014). Además, ofrece una buena absorción de radiación azul de la que recientemente se ha relacionado con efectos biológicos pro-oxidantes (Nakashima et al. 2017). Se pueden utilizar agentes alternativos como los filtros físicos o inorgánicos (TiO_2 y ZnO entre otros) que funcionan reflejando y dispersando la radiación pero al igual que los filtros químicos mayoritariamente por disipación de la energía en forma de calor. Estos filtros pueden complementar y aumentar la fotoprotección proporcionada por los filtros solares orgánicos (filtros químicos), y los de origen biológico como en el caso del extracto de *H. cornea*, extracto de *G. biloba* y el aceite de Karanja añadido a los productos elaborados en este estudio. Los metabolitos que otorgan la fotoprotección se rigen por los mismos principios físico-químicos que los filtros químicos (Wang & Lim 2016).

El valor funcional de los preparados cosméticos elaborados en este estudio, no solo depende de su factor de protección solar sino también de su capacidad antioxidante. Las cremas con mayor capacidad antioxidante fueron aquellas que contenían todos los componentes fotoprotectores y bioactivos descritos en la formulación, aunque sus valores no se incrementan de forma lineal debido a las interferencias o interacciones negativas que puedan darse entre los diferentes componentes. El segundo preparado cosmético que más actividad antioxidante demostró fue, el que contenía extractos de *H. cornea* (15% del total de la crema) y extracto de *G. biloba* (5% del total de la crema) además de aceite de Karanja. Estos tres componentes añadidos a un producto cosmético, aumentan la capacidad antioxidante respecto a los valores basales. Estos resultados concuerdan con las descripciones de otros autores en materia de capacidad antioxidante para estos productos (Obadijah et al. 2012; Bridi et al. 2001; Álvarez-Gómez et al. 2016). Tanto en el presente capítulo, como en los anteriores (**Capítulos 1, 2, y 4**) la capacidad antioxidante de *H. cornea* fue evaluada obteniendo resultados satisfactorios muy por encima de otras especies algales (Álvarez-Gómez et al. 2016). Recientemente, Mercurio et al. (2015) evaluaron los efectos fotoprotectores de formulaciones cosméticas que contienen filtros UVR, entre ellos, extracto de alga roja (*Porphyra umbilicalis*), y combinaciones del extracto con vitaminas y *Ginkgo biloba* a través del uso de estudios preclínicos *in vivo*. Para este estudio, 4 grupos de 4 ratones sin pelo fueron tratados con formulaciones tópicas aplicadas en el dorso durante 5 días. Los efectos de estas formulaciones se evaluaron determinando la pérdida de agua transepidérmica y el eritema. Los resultados mostraron que las formulaciones protegían la piel del eritema cuando se exponían a la UVR.

Las conclusiones de este estudio ponen de manifiesto que estos ingredientes resultan efectivos formulaciones de filtros solares.

Las diferentes longitudes de onda y la energía asociada con la subdivisión UV, corresponden a efectos claramente distintos en la piel humana (Lindqvist et al. 2016) por lo que en este estudio, se evaluó la capacidad óptica y fotoprotectora de los preparados cosméticos teniendo en cuenta los intervalos espectrales más relevantes para obtener un producto que blinde de los efectos nocivos de la UVR. Es necesario tener en cuenta que, durante un día de verano, el espectro UV que llega a la superficie terrestre presenta un 3.5% de UVB y un 96.5% de UVA. La UVB se asocia principalmente con eritema y quemaduras solares e inmunosupresión y fotocarcinogénesis entre otros efectos biológicos (Tuchinda et al. 2006). La radiación UVA se ve menos afectada por los cambios en las condiciones atmosféricas relacionados la nubosidad o niveles de aerosoles. La radiación UVA, en comparación con la UVB, puede penetrar más profundamente a través de la piel (Tuchinda et al. 2006) siendo principalmente responsable del fotoenvejecimiento y cáncer de piel (Slaney 2001, Young 2003). Es por esto por lo que los esfuerzos científicos actuales están enfocados en la fotoprotección a estas longitudes de onda (UVA_{FPS}). De acuerdo a la literatura científica, un fotoprotector ideal sería aquel capaz de absorber/reflejar la energía procedente de UVA en un tercio respecto al intervalo de UVR total (290-400 nm), por lo tanto, los valores ideales de UVA_{FPS} serían de 1/3 (FPS: UVA_{FPS}) del FPS (290-400 nm) (Osterwalder et al. 2014). En los productos elaborados en este capítulo, se obtienen estos valores en el producto elaborado con filtros químicos (F_q), en la mezcla de filtros químicos más biológicos (F_{b2+q}) y en la mezcla de filtros biológicos (extracto de *H. cornea* y aceite de Karanja) (F_{bi}). Aunque para la búsqueda de un producto cosmético dentro del encaje “cosmética natural” no es posible la adición de filtros químicos, y solo se permite la inclusión de filtros físicos o inorgánicos no particulados los cuales se asumen que proceden de fuentes minerales naturales (Kostyuk et al. 2017).

La eficacia de la UVR para inducir el eritema disminuye rápidamente a mayores longitudes de onda (Miller et al. 2017). Para producir la misma respuesta eritematosa, es necesario aproximadamente 1000 veces más de dosis UVA en comparación con UVB (Parrish et al. 1982), por lo que a pesar de que la UVA penetre más en profundidad, los fotones de UVB son más energéticos y pueden causar más daño a nivel molecular. El eritema se evidencia inmediatamente al final del período de irradiación (Kaidbey & Kligman 1979; Parrish et al. 1982; Moyal et al. 2000), se desvanece en varias horas, seguido por un eritema retrasado a partir de las 6 h y alcanzando su pico a las 24 h (Hawk et al. 1983). En resumen, la radiación UVB es más efectiva que la radiación UVA en la producción de eritema pero también de la metalogénesis (pigmentación retardada o duradera). Mientras que la UVA es responsable de la pigmentación inmediata pero no tiene una carácter duradero respecto al que produce la UVB (Miyamura et al. 2011). Los productos de cuidado de la piel para la protección UVR, deben utilizarse para reducir y/o suprimir los efectos nocivos de la UVR. Por lo tanto, la protección UVR se convierte

en una función principal de más tipos de formulaciones cosméticas. Es principalmente aquí donde el uso de las algas como agente cosmeceútico cobra sentido. En líneas generales, el interés cosmético que suscita la biotecnología algal, es la fotoprotección y la actividad antioxidante de los metabolitos que contienen estos organismos (Schmid et al. 2004; Ariede et al. 2017). Así pues, los componentes bioactivos procedentes de *H. cornea*, *G. biloba* y *P. pinnata* (aceite de karanja), ofrecen la dualidad de fotoprotección y barrido de radicales libres (capacidad antioxidante) que la UVR genera. La exposición de la piel a la UVR genera especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (RS). Esta acumulación de RS conduce al fotoenvejecimiento y patología como cáncer de piel no melanoma (cáncer espinocelular y basocelular) (Pallela et al. 2010; Barton et al. 2017).

De la Coba (2007) demostró que la mezcla de los aminoácidos tipo micosporina (MAAs) Porphyra-334 y Shinorine (en proporción 8:1.5) extraídas de *Porphyra leucosticta* pueden ser considerados un fotoprotector que, aplicado tópicamente, presenta muy buenos resultados como filtro químico en ensayos de fotoprotección (FPS de 3 aproximadamente), cumpliendo además con los principales requerimientos para que se le pueda considerar un filtro con potencialidad en el mercado: amplio espectro de protección, alto coeficiente de extinción molar, no causa irritabilidad y presenta alta estabilidad frente al pH, la fotodegradación y la termólisis. Como resultado de estos hallazgos, se han publicado diversas patentes referentes a las aplicaciones de los MAAs entre ellas algunas destinadas a los usos de Porphyra-334 en productos para la prevención y tratamiento del eritema, fotocarcinogénesis y fotoenvejecimiento (P200702945), como antioxidante o aditivo en productos alimentarios (P200702946) o en la prevención de la oxidación de productos cosméticos y farmacéuticos (P200702947). El extracto de *H. cornea*, contiene un alto contenido de estos aminoácidos tanto en la composición total (% en peso seco de biomasa algal) como en la productividad ($\text{g MAAs m}^{-2} \text{ d}^{-1}$). La mayoría de estos estudios se basan en el Método de Diffey según el cual para la elaboración de 250 mg de crema fotoprotectora con un FPS 8 la cantidad purificada de MAAs necesaria equivale al 5% del total, es decir, 12.5 mg. Teniendo en cuenta además que el método de purificación de MAAs posee una eficiencia del 50% puede obtenerse una cifra de 910 g de crema fotoprotectora producida al año a partir de los 91 g de MAAs obtenidos anualmente de *H. cornea* producida en las instalaciones del BEA en Gran Canaria. Una vez evaluado el rendimiento del sistema propuesto, tanto en términos de eficiencia de biofiltración como en términos de obtención de productos de interés a partir de la biomasa, es necesario hacer algunas consideraciones sobre las limitaciones del mismo. La valoración del rendimiento del sistema se ha realizado por extrapolación de los datos medios obtenidos en los experimentos del presente proyecto, de una duración de 5 semanas. En los últimos años se ha desarrollado una base de datos sobre compuestos fotoprotectores en algas que pueden aportar fotoprotección y contra el fotoenvejecimiento inducido por UVR (Gröniger et al. 2000). En este listado se enumeran diferentes MAAs (Palythine, Asterina-330, Palythinol, Porphyra-334, Shinorine, entre otros) extraídos de diferentes especies de algas y con demostradas propiedades fotoprotectoras y

antioxidantes tanto en *in vitro* como *in vivo* así como en modelos animales y humanos (Cardozo et al. 2007). El extracto de *H. cornea* empleado como filtro biológico contiene todos estos aminoácidos citados y en diferentes proporciones dependiendo de las condiciones (disponibilidad de nutrientes, exposición a UVR, temperatura, etc.) donde haya sido cultivado el organismo (**Capítulos 1, 2 y 4**).

Si se aplica correctamente, una fotoprotección considerada como baja (FPS 5), obtenida en el preparado cosmético solo con extracto de *H. cornea*, conseguiría una reducción del 80% de UVB. Una fotoprotección media (FPS 15), obtenida en el preparado cosmético con extracto de *H. cornea* más extracto de *G. biloba* y aceite de Karanja) proporcionaría una reducción del 93% UVB. Sin embargo, una fotoprotección elevada (FPS 50), conseguiría reducir la UVB en un 98%. Por lo tanto, aunque un fotoprotector con FPS 50 sea mejor que otro que posea un FPS 15, en términos de reducción de UVB, usar un producto con FPS 50 solo supone un incremento del 5% más de fotoprotección respecto a un producto con FPS 15 (Gilaberte et al. 2003). En todo caso, las cremas del mercado con FPS 50 tienen evidentemente mayor protección contra diferentes efectos biológicos (FAPEB) que las cremas de FPS 15. A largo plazo, el uso de filtros de protección solar de origen natural sería mucho más atractivo. Sin embargo, en este sentido, todavía hay mucha información escasa en la literatura científica (Cavinato et al. 2017). La conciencia cada vez mayor del consumidor de los peligros del sol, ha influenciado la industria cosmética incrementando la producción e investigación de productos cosméticos fotoprotectores naturales. Es necesario abordar, que en la última década, se han hecho grandes esfuerzos por desarrollar filtros solares sin la necesidad de altas cantidades de productos químicos, ya que muchos de estos se han asociado con reacciones alérgicas o fototoxicidad (Kawakami & Gaspar 2015), baja fotoestabilidad y biodegradabilidad además de una falta de efectividad en la protección real de la piel (Kockler et al. 2012). La ausencia de actividad endocrina para estos filtros químicos (Tinosorb M y S) ha sido demostrada anteriormente mediante ensayos *in vitro* (Ashby et al. 2001).

Otra problemática surgida del uso de filtros físicos y químicos, es la medioambiental. Estos ingresan al medio acuático indirectamente a través de los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales (urbanas e industriales) o directamente, a través de actividades recreativas acuáticas humanas (Brausch & Rand 2011; Sánchez-Quiles & Tovar-Sánchez 2014; Sendra et al. 2017). Se han detectado filtros químicos en aguas tanto costeras como continentales (Zenker et al. 2008, Fent et al. 2010). Estos podrían causar un blanqueo de los corales, incluso a concentraciones extremadamente bajas (Danovaro et al. 2008). Se han encontrado filtros UVR en invertebrados y peces (Balmer et al. 2005; Kaiser et al. 2012). Además, Sánchez-Quiles & Tovar-Sánchez (2014) demostraron que los filtros de TiO₂ (nanoparticulados) producen peróxido de hidrógeno en aguas costeras, concluyendo que actuaría como un agente oxidante en las aguas que ingresan en áreas turísticas con consecuencias ecológicas directas sobre los ecosistemas.

En el presente capítulo de esta Tesis Doctoral, se propone como complemento a los clásicos parámetros fotoprotectores que vienen usándose desde hace décadas (FPS y UVA_{FPS}), los Factores de Protección Frente a Efectos Biológicos (FAPEB), los cuales ofrezcan una información más detallada sobre la fotoprotección frente a otros efectos biológicos inducidos por UVB y UVA (López-Figueroa et al. 2009). Si bien, el FPS (290–400 nm) solo tiene en cuenta para su cálculo el espectro de acción para la producción de eritema en la piel y el UVA_{FPS} , el espectro de acción para la pigmentación persistente, el FAPEB es propuesto en este estudio como un nuevo parámetro integrador de otros efectos biológicos tanto de UVB como de UVA (13 además de los dos empleados para el FPS y UVA_{FPS} , ver espectros de acción en Material y métodos generales, Ep. 19.2) sobre patologías de la piel, ojos y a nivel molecular. Así pues, debido a la novedad que supone este nuevo parámetro, no existen valores estándar ideales como en el caso del FPS y UVA_{FPS} , los cuales sirvan como referencia para realizar comparativas entre productos o formulaciones. Los resultados que arrojan este estudio para las formulaciones propuestas, muestran los valores de $FAPEB_{UVB}$ y $FAPEB_{UVA}$ más altos en los preparados donde se mezclaron los filtros físicos y químicos, ya que ambos ofrecen absorción conjunta a cada intervalo espectral consiguiendo así un fotoprotector de amplio espectro (Osterwalder et al. 2014). También, la mezcla entre los filtros químicos y biológicos otorga al producto cosmético una alta fotoprotección frente a otros efectos biológicos. Para este nuevo parámetro fotoprotector para otros efectos biológicos relacionados con la dermis, ojos y a nivel molecular, también se han logrado unos aceptables resultados cuando solamente se aplicaron filtros biológicos (extracto de *H. cornea*, extracto de *G. biloba* y aceite de Karanja). La amplia fotoprotección que otorgan las sinergias entre los metabolitos de estos productos naturales, consiguen obtener en un producto un amplio espectro de absorción tanto de $FAPEB_{UVB}$ como de $FAPEB_{UVA}$ que proteja de los efectos biológicos nocivos de esta radiación sobre la piel, ojos y nivel molecular (Almutawa et al. 2013). Además, las correlaciones encontradas entre el FPS y el FAPEB (tanto UVB como UVA), confirman la potencialidad del uso de este nuevo parámetro fotoprotector, sumado a que el parámetro *in vitro* de FPS obtenido mediante el método Colipa 2011, se correlaciona con el parámetro *in vivo* de FPS obtenido de acuerdo a la metodología descrita por Heinrich et al. (2004). El estudio se hizo con diferentes productos de protección solar clasificados en 5 grupos diferentes (emulsión, aceite, alcohol, fluido espeso y polvo), se demostró que nuestro método tiene buena reproducibilidad y precisión en comparación con el método clínico (*in vivo*) de FPS. De hecho, el coeficiente de variación promedio (CV%) fue aproximadamente del 7%, y el coeficiente de correlación alcanzó aproximadamente 0.8-1.0 para los diferentes tipos de productos probados (Miksa et al. 2015, 2016).

Además de las propiedades antioxidantes de los MAAs, en los últimos años han surgido otras propiedades biológicas interesantes de gran aplicabilidad en el ámbito cosmeceútico. El aminoácido Porphyrin-334 protege contra la formación de dímeros de ADN lo cual contribuye a la reducción del daño del ADN debido a UVR (Misonou et al. 2003). De la Caba et al. (2009) también demostraron que

Porphyra-334 más Shinorine contrarrestaron los cambios bioquímicos en la piel de ratones albinos, expuesta a UV al mantener la expresión de la proteína de choque térmico Hsp70, un biomarcador potencial de daño UV agudo. El aminoácido Pophyra-334 es quizás el que más potencialidad cosmecéutica presenta, puesto que previene el fotoenvejecimiento inhibiendo la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la metaloproteínasa en la piel, así como inductor de los componentes de la matriz extracelular (procolágeno, colágeno tipo I, elastina) y de la expresión proteica en fibroblastos humanos irradiados con UVA (Ryu et al. 2014). Hartmann et al. (2015) investigaron el potencial de inhibición de la enzima colagenasa (responsable de la degradación del colágeno dérmico) a partir de MAAs aislados de algas rojas *Porphyra* sp. y *Palmaria palmata*. Choi et al. (2015), encontraron que los MAAs tienen efectos significativos en el proceso de cicatrización de heridas en queratinocitos humanos mediados por activación de quinasas de adhesión focal (FAK), quinasas reguladas por señal extracelular (ERK) y quinasas N-terminales c-Jun (JNK). Estos resultados sugieren que los MAA aceleran la reparación de heridas activando las vías de señalización FAK-MAPK. Este estudio también indica que los MAAs pueden actuar como un nuevo agente de curación de heridas y además sugiere que los MAAs podrían ser un biomaterial novedoso para las terapias de curación de heridas. Suh et al. (2014b), investigaron en la línea celular de fibroblastos humanos HaCaT, los niveles de expresión de genes asociados con la actividad antioxidante, la inflamación y el envejecimiento de la piel en respuesta a UVR. Además, en presencia de MAAs, los genes supresores de UVR, de procolágeno C (gen *PCOLCE*) y los genes que codifican para la biosíntesis de elastina, que están relacionados con el envejecimiento de la piel, mostraron mayores niveles de expresión incrementados iguales a los de las células tratadas con UVR. Por último, más recientemente, Becker et al. (2016) estudiaron el rol de los MAAs como agentes inmunomoduladores en defensa de las vías reguladoras que se activan en el área inflamada en células mielomonocíticas humanas (cáncer de sangre). Se estudió el efecto de los MAAs en las cascadas de señalización central, como la activación del factor nuclear de transcripción factor kappa b (NF- κ B), así como el metabolismo del triptófano. Los MAAs indujeron la actividad de NF- κ B por lo que las vías inflamatorias se ven afectadas por los MAAs, pero a pesar de la similitud estructural entre los distintos MAAs estudiados (Porhyra-334 y Shinorine), se observaron diversos efectos en la línea celular estudiada.

5. Conclusiones

La piel humana está expuesta a la UVR la cual está presente de forma natural en la luz solar (Svobodová et al. 2003). La humanidad demanda, cada vez más, productos que les permitan permanecer en el sol durante un período de tiempo más largo sin que esto provoque efectos y patologías adversas sobre la piel. El extracto de *H. cornea* presenta efectos únicos en términos de fotoprotección

contra UVR y contra los radicales libres debido a su alta capacidad antioxidante, por lo que su uso en productos cosméticos puede considerarse como una alternativa dirigida a reducir la cantidad de filtros sintéticos en las formulaciones de protección solar. Además, la combinación de este extracto algal, junto con otros compuestos vegetales (extracto de *Ginkgo biloba* y aceite de Karanja procedente del árbol *Pongamia pinnata*) y adición de vitaminas E y C puede mejorar significativamente el rendimiento de los filtros solares en la prevención del fotodaño debido a los efectos sinérgicos entre sus componentes. Por tanto, el extracto de *H. cornea* es un ingrediente bioactivo con una dualidad demostrada (fotoprotectora y antioxidante) y que puede ser empleado en las formulaciones de protección solar, más aún si estos se complementan con filtros físicos (ZnO y TiO₂) los cuales mejoran considerablemente la fotoprotección en UVA y UVB, sin restar al producto el incentivo de “cosmética natural”.

En este estudio se demostró que el uso de un solo componente natural no es suficiente para la fotoprotección completa puesto que cada componente con capacidad fotoprotectora, presenta un intervalo espectral de absorción diferente. Por lo tanto, la búsqueda de la combinación de fotoprotectores que estén aceptados dentro del marco de la “cosmética natural” ha sido la estrategia a seguir en este estudio. Los filtros químicos, a pesar de poseer una alta capacidad de absorción de UVR, tienen que ir siendo sustituidos por filtros biológicos los cuales, cumpla con los requisitos de fotoestabilidad, termoestabilidad, capacidad antioxidante etc. y en general que no repercuta sobre su capacidad fotoprotectora. Este estudio, da un paso más en la búsqueda y evaluación de componentes naturales fotoprotectores (extracto de *H. cornea*, extracto de *G. biloba* y aceite de Karanja) en combinación con vitaminas ampliamente empleadas en cosmética para preservar la integridad fisicoquímica del producto elaborado. Aunque esta combinación no alcanza los valores fotoprotectores encontrados cuando se emplean filtros químicos, al menos se aproxima y mejora sin adición de compuestos obtenidos mediante síntesis química.

Por último es necesario destacar que el mercado mundial de la cosmética crecerá a un ritmo del 3.7% anual en los próximos tres años, según estima la consultora estadounidense Allied Market Research (Person 2014; Umemura & Slater 2017). Se calcula que las ventas del sector asciendan a 290.070 millones de dólares (265.681 millones de euros). Los productos para el cuidado de la piel serán los que dominarán este mercado. Les seguirán entre los más consumidos, las cremas fotoprotectoras y los productos para el cuidado del cabello. Entre las tres categorías concentran las tres quintas partes del sector y su ritmo de crecimiento anual hasta 2020 alcanzaría el 5.6%. Además, por regiones, Europa agrupará en los próximos cinco años el 30% de las ventas mundiales y continuará dominando el sector. Estados Unidos, en cambio, lidera el mercado en el consumo online de este tipo de artículos. Por el momento, el mayor gasto en cosmética continúa realizándose en las tiendas físicas,

aunque se estima que vaya trasladándose a Internet, sobre todo en países asiáticos, como Japón, China o India.

Discusión general

A finales del SXXI se espera que alcancemos en la Tierra la cifra de 10.000 millones de habitantes lo cual supondrá una demanda muy alta de nuevos recursos alimentarios y energéticos para los próximos años. Las algas se han propuesto como una fuente alternativa de alimento, especialmente las microalgas cultivadas en áreas que no compitan con la agricultura, y además sin usar agua potable como es el caso de los cultivos en agua de mar suplementada con efluentes de diverso origen (urbano, ganadero o acuícola). La fertilización de los medios de cultivo con aguas residuales y los avances tecnológicos en los sistemas de cosechado, abaratarán los costes de producción de las microalgas y harán rentable su cultivo para uso alimentario en la fabricación de piensos para animales y producción de bioestimulantes (Acién et al. 2016) o alimento directo humano en medios de cultivo basados en fertilizantes agrícolas. Las macroalgas están también tomando cada vez más importancia en su uso alimentario (Tiwari & Troy 2015). En los últimos años, están apareciendo cada vez más publicaciones en el ámbito de la gastronomía las cuales promueven el uso de las macroalgas. Dos ejemplos, el libro titulado “¿Las algas se comen? Un periplo por la biología, la historia, las curiosidades y la gastronomía” de Pérez-Lloréns et al 2016, de la Universidad de Cádiz, en el que reúnen recetas de Chefs que suman entre todos ellos 50 estrellas Michelin, o el libro “Algas, las verduras del Mar” de la nutricionista Montse Bradford promotora de alimentación natural y energética. Empresas del sector de algas para alimentación en España como Puerto Muiños y Algamar en Galicia, presentan en sus webs numerosas recetas culinarias con algas marinas. De 28.5 millones de toneladas de macroalgas que se han usado por la industria alimentaria en el año 2014 según la FAO 2016, un 95% proceden de la acuicultura y un 5% de recolección (Forster & Radulovich, 2015). En el cultivo destacan los países orientales (China, Japón y Corea) e Indonesia y en el cosechado, China, Noruega y Chile (Buschmann et al. 2017). Esto supone solo una aportación del 0.3% respecto al conjunto de los alimentos producidos tanto de origen vegetal como animal, por lo que se está aún muy lejos de una contribución relevante de las algas en la alimentación humana.

Además del uso alimentario y energético, las algas son un fuente de biomasa para la obtención de productos cosméticos, farmacológicos además de prestar servicios ambientales la biorradiación de aguas (Erwes & Pitta e Cunha 2014). (Figura D.1).

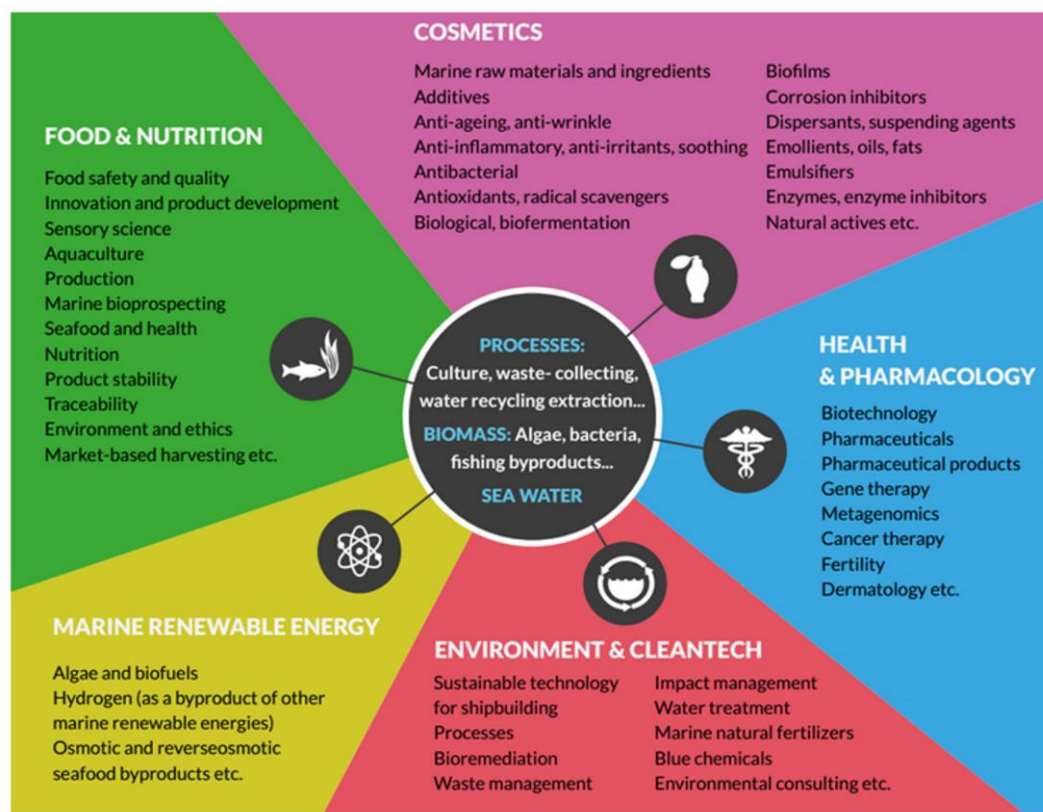


Figura D.1. Diversos usos de algas en el campo de alimentación y nutrición, cosmética, salud y farmacología, medioambiente y biorremediación y energía renovables. (Erwes & Pitta e Cunha 2014)

El mercado de la economía azul ha generado en el año 2014, 176.000 millones de dólares y para el año 2020 se estima que la acuicultura pasará del 12% al 35%, los productos cosméticos de origen marino pasarán del 13% al 30%, los nutraceuticos de origen marino del 32% del mercado global al 55% y la Biotecnología marina del 8% del total del mercado tecnológico al 15% (Erwes & Pitta e Cunha 2014). Son cifras de crecimiento muy relevante que proyecta una gran actividad en este sector para los próximos años. Las aplicaciones están siendo tan amplias que algunos autores ha llegado a denominar a este periodo de investigación como “The algal revolution” (Brodie et al. 2017).

Si se hace un estudio de la evolución de las publicaciones científicas en el sector de la Biotecnología marina a través del buscador de WOS (Web Of Science) y concretamente con las palabras clave “Algae extracts and bioactive compounds“, “Algae biorefinery“, “Algae biorremediation” y “Cosmetic algae”, se puede observar un incremento exponencial de trabajos en las últimas dos décadas, lo cual demuestra el gran interés por el uso de las algas en diversas áreas científicas (Jahan et al. 2017) (Figura D.2)

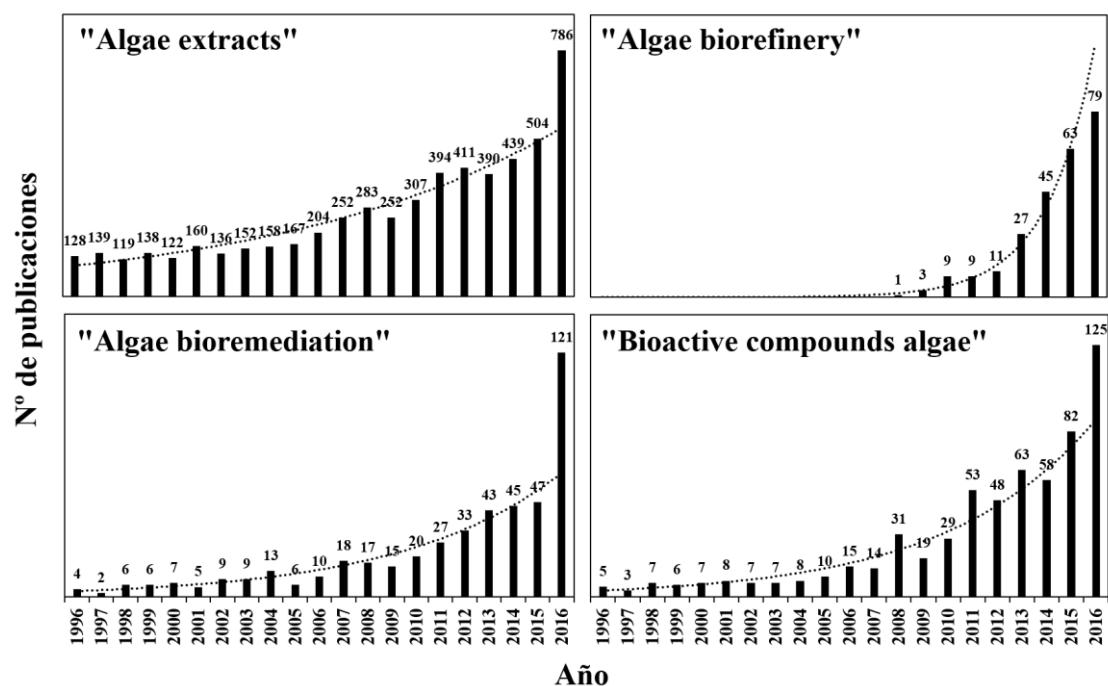


Figura D.2. Número de publicaciones científicas por búsqueda de palabras clave encontradas en WOS (Web Of Science) desde 1996 hasta 2016.

Entre los phylum más estudiados en investigación de productos naturales marinos durante los últimos 50 años, tras el phylum Porifera, Cnidaria y Ascomycota, se encuentran las algas rojas pertenecientes al phylum Rhodophyta (Blunt et al. 2016) el cual comprende al 70% de las especies algales estudiadas en esta Tesis Doctoral.

Las especies empleadas en el estudio de ficoprospección de esta Tesis Doctoral fueron predominantemente macroalgas rojas: *Gelidium corneum* (Hudson) J.V. Lamouroux, *Gelidium pusillum* (Stackhouse) Le Jolis, *Porphyra umbilicalis* Kützting, *Halopithys incurva* (Hudson) Batters, *Gracilariopsis longissima* (S.G.Gmelin) M.Steentoft, L.M.Irvine & W.F.Farnham e *Hydropuntia cornea* (J.Agardh) M.J.Wynne. También se investigó, de forma muy puntual, la macroalga verde *Ulva rotundata* Bliding y el liquen marino *Lichina pygmaea* el cual se usó como control positivo de compuestos bioactivos, por ejemplo Micosporina-Glicina (De la Coba et al. 2009), aunque este liquen no sea una especie cultivable. Entre las especies escogidas, están algunas con tecnología de cultivo en forma vegetativa y en medios con altos niveles de $N-NH_4^+$ como *H. cornea*, *G. longissima* y *H. incurva*, aunque esta última tiene bajas tasas de crecimiento (Pinchetti et al. 2011). Otras especies necesitan de una tecnología de cultivo compleja, como es el caso de *Porphyra umbilicalis*, la cual presenta una fase haploide (macroscópica) y otra fase diploide (conchocelis microscópica). Finalmente, las especies del género *Gelidium* son de gran interés biotecnológico por su composición en polisacáridos, ficobiliproteínas (Stengel & Connan 2011) y MAAs (De la Coba et al. 2009) pero su cultivo en tanques o en el medio natural ha sido infructuoso (Rico et al. 1990; Melo et al. 1990; García-Reina et al. 1991)

Ya se han realizado ficoprospecciones de actividades antioxidantes en macroalgas del Sur de España, lugar con alta potencialidad por las condiciones de irradiancia y temperatura y evaluación de propiedades nutricionales de macroalgas comestibles de otras áreas de España (Plaza del Moral 2010; Gómez Ordoñez 2013). Es destacable también las investigaciones que se realizan en Galicia con macroalgas basada en Acuicultura multitrófica (Cremades et al. 2011).

Concretamente, Güenaga et al. (2011), comparó la actividad antioxidante y composición fenólica de algas recolectadas en el medio costero de la isla de Gran Canaria, y algas cultivadas en tanques con agua de mar suplementada con altos niveles de N-NH_4^+ , emulando las condiciones de los efluentes de una piscifactoría. Las macroalgas intermareales en su medio natural se encuentran sometidas a mayores estresores ambientales y en general, presentan mayores valores de capacidad antioxidante que las algas cultivadas en el laboratorio (Kadam et al. 2015). Este aumento del estrés provoca un incremento de sustancias antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas (Stengel et al. 2011). No obstante, Güenaga (2011), no encontró diferencias significativas entre las algas del medio natural y las cultivadas en altos niveles de N-NH_4^+ . Estos resultados son interesantes ya que se hubiera esperado una caída drástica en cultivo bajo condiciones no estresantes. No se descarta que en el cultivo en tanques se produzca también estrés, pues las algas pasan de estar fijadas a un sustrato con un hidrodinamismo natural, a flotar libremente. Además las condiciones lumínicas puede ser desfavorables e incluso, el estímulo de UVR, relacionado con la estimulación de los mecanismos de defensa, está reducido en los tanques de cultivo (Figuerola et al. 2012).

La biomasa algal y líquénica fue sometida a un proceso de extracción con solventes alcohólicos e hidroalcohólicos con la finalidad de maximizar la extracción de compuestos de interés. Los procesos de extracción para estas especies no fueron selectivos, si no que se basaron en la capacidad de disolver los metabolitos de interés mediante solventes químicamente afines. Los extractos para cada especie, como producto resultante, fueron una mezcla de diferentes compuestos químicos los cuales fueron capaces de ser solubilizados en los solventes empleados. Los factores que influyeron en la composición y la bioactividad de los extractos algales dependieron de las especies, de las condiciones ambientales donde se recolectaron, de la estación del año, de la ubicación geográfica y de las tecnologías de extracción empleadas (Kadam et al. 2013). En general, para todas las especies estudiadas, el contenido de MAAs usando EtOH 100% como solvente, fue mucho menor que para otros solventes debido a la baja polaridad de este para interactuar con la parte hidrofóbica de los aminoácidos y péptidos. Se detectaron compuestos fenólicos en todas las especies analizadas. Los altos niveles de compuestos fenólicos en *H. incurva* ya han sido reportados previamente por Güenaga (2011). Los niveles de compuestos fenólicos pueden variar hasta tres veces, dependiendo del método de extracción empleado y el tipo de secado de la biomasa (López et al. 2011; Leyton et al. 2016).

Los resultados antioxidantes para las especies de esta Tesis Doctoral, concuerdan con los resultados encontrados por Sarikurkcü et al. (2009) para extractos de plantas terrestres, en los que se observó una fuerte correlación entre la polaridad de los extractos y su potencial antioxidante. Los extractos más polares fue lo que mostraron un mayor potencial antioxidante. Por primera vez, y en esta Tesis Doctoral, se describe en la literatura científica para *G. longissima* y *H. incurva*, un compuesto bromofenólico sulfatado (3-bromo-4,5-dihidroxifeniletanol sulfato: $C_8H_9BrO_6S$), con una masa atómica observada de 334.91954 (para ambas especies) y una masa atómica calculada de 334.91959 (ppm 0.1) y 334.96646 (ppm 0.06) para *G. longissima* y *H. incurva* respectivamente. Este bromofenol sulfatado ha sido descrito como sustancia anticancerígena (Liu et al. 2011) en varias líneas celulares humanas de cáncer HCT-8, Bel-7402, BGC-823, A549 y A2780 (Ma et al. 2006).

La actividad antioxidante entre las macroalgas y el líquen marino analizados, recolectados del medio natural, fue alta (5-15 $\mu\text{mol TEAC g}^{-1}$ PS) lo cual se encuentra en el rango de los resultados publicados en otros estudios para varias microalgas (7-11 $\mu\text{mol TEAC g}^{-1}$ PS) y más altos que el de otras macroalgas (1.6-2.2 $\mu\text{mol TEAC g}^{-1}$ PS) (Matanjun et al. 2008). En este estudio para el solvente acuoso (H_2O), la capacidad antioxidante obtenida de los métodos DPPH y ABTS fue similar en el 55% de las especies estudiadas. Entre estos dos ensayos antioxidantes, el solvente con mayor capacidad de extracción de antioxidantes fue el EtOH 50%, para el 44% y el 56% de las especies estudiadas, en los métodos ABTS y DPPH respectivamente. En última instancia, la polaridad del solvente, así como la técnica de extracción, tienen un efecto crítico sobre el rendimiento de extracción (López et al. 2011). El metanol, sin embargo, debería de ser descartado para aplicaciones cosméticas debido a su toxicidad. En el método BBM, el mejor solvente fue EtOH 100%, probablemente relacionado con el hecho de que este método es adecuado para la determinación de compuestos antioxidantes en un medio estrictamente lipofílico. Entre los ensayos utilizados en este estudio para el barrido de radicales, los métodos ABTS y DPPH son los más rápidos, simples (no incluyen muchos pasos) y tienen un menor coste en comparación con el método BBM. Por el contrario, el método BBM requiere muchos más reactivos, mucho más tiempo y más recursos técnicos para la realización del ensayo. Además, el resultado sólo proporciona una visión de los antioxidantes que se encuentren en la matriz lipofílica. Por tanto, el ensayo ABTS es el único método evaluado en este estudio que es aplicable tanto a antioxidantes hidrofílicos como lipofílicos (Alam et al. 2013), por lo que su uso es justificado en otros estudios en los que se pretende obtener una visión integrada del extracto. Se encontró una correlación positiva entre los métodos DPPH y ABTS, ABTS-BBM y DPPH-BBM. Floegel et al. (2011) también encontraron una correlación positiva entre los métodos DPPH y ABTS al igual que en este estudio.

En esta Tesis nos hemos centrado en el estudio de las aplicaciones cosmeceúticas de la biomasa, investigando la posible fotoestimulación por UVR y los efectos de la alta disponibilidad de nutrientes (fundamentalmente $N-HN_4^+$) sobre la acumulación de compuestos bioactivos de alto valor

biotecnológico como son las sustancias antioxidantes y fotoprotectoras que tienen también carácter nutracéutico. La producción de compuestos bioactivos requiere una buena productividad de biomasa, esta producción debe ser monitorizada y controlada a través del estado fisiológico de las algas mediante sistemas no intrusivos, como es la fluorescencia *in vivo* de la clorofila *a* (Figueroa et al. 2012; Jerez et al. 2016).

A continuación se hace una síntesis crítica de los resultados de la tesis abordando en primer lugar, los datos relativos al crecimiento, morfología, productividad la biomasa, biofiltración de N-NH_4^+ y control del estado fisiológico y producción fotosintética mediante la fluorescencia *in vivo* de la clorofila *a*, después se discutirán los resultados relacionados con la acumulación de compuestos de metabolismo primario (proteínas, lípidos y carbohidratos) en un contexto de uso nutracéutico de la biomasa y de compuestos de metabolismo secundario (pigmentos accesorios como las ficobiliproteínas, MAAs y compuestos fenólicos) así como la actividad antioxidante relacionada con el contenido y composición de estos metabolitos contenido en los extractos de *Hydropuntia cornea* y *Gracilariopsis longissima*. Se discute el uso de estos compuestos como cosmeceúticos. Finalmente, en el último capítulo se trata la aplicación cosmética de los extractos analizando la citotoxicidad de esto en *H. cornea* y *G. longissima* en líneas celulares estandarizadas (humanas y murinas), así como su inmunológica terminando con el diseño y valoración de un producto cosmético con capacidad antioxidante y fotoprotectora basado en extractos concentrados de *H. cornea* y otros componentes empleados en cosmética natural.

1. Crecimiento, morfología, productividad de la biomasa, tasa fotosintética y biofiltración

El uso de macroalgas como organismos biofiltrantes en un sistema de biodepuración está ampliamente descrito en la literatura científica (Buschmann et al. 2017), máxime si a partir de la biomasa resultante, se obtienen productos con alto valor añadido (Stengel & Connan, 2015; Macciavello & Bulboa 2017). El cultivo en altos niveles de N-NH_4^+ pretende emular las condiciones que se dan en efluentes de diverso origen como pueden ser las piscifactorías, y por lo tanto, en la simulación de sistemas de acuicultura multitrófica integrada (IMTA). En este estudio nos hemos centrado en dos especies, *Hydropuntia cornea* y *Gracilariopsis longissima* para las cuales existe tecnología de cultivo y ya han sido cultivadas satisfactoriamente. *H. cornea* es una alga de origen tropical (Nuñez-Rezendiz et al. 2016) que se cultiva de forma vegetativa en tanques de 800-1500 L de capacidad en agua de mar suplementada con efluentes de piscifactorías o N-NH_4^+ que los emulan (Suárez Álvarez, 2004; Benkaddour, 2006; González-González, 2010) presentando una alta eliminación de nutrientes (Pinchetti et al 2011; Figueroa et al. 2012; Robledo et al. 2014). En cultivos

a una densidad de 6 g PF L⁻¹, se encontró una alta productividad de biomasa en *H. cornea* (22-29 g de PS m⁻² d⁻¹) (Viera et al. 2011; Gómez-Pinchetti et al., 2011). Por otro lado, *G. longissima* es un alga de climas templados que crece en esteros también con altos niveles de N (Hernández et al. 2006) y que está investigándose su cultivo de forma vegetativa en sistemas de cuerdas en la Bahía de Cádiz (Ortega 2015), por lo tanto, esta especie se ha cultivado en sistemas de acuicultura extensiva mostrando un buen crecimiento respecto a otras especies (9 % d⁻¹) (Hernández et al. 2006). Otra especie a la que se le ha prestado más atención en esta Tesis Doctoral, ha sido *Halophytis incurva*, la cual también ha cultivada en efluentes de piscifactoría a una densidad de 5 g PF L⁻¹ con una productividad de biomasa de aproximadamente 16 g de PS m⁻² d⁻¹ (más baja que en *H. cornea* y *G. longissima*) y una eficiencia de asimilación de nitrógeno (NUE) del 47% (Gómez-Pinchetti et al. 2011).

Así pues, en esta Tesis Doctoral, se cultivaron *H. cornea*, *G. longissima* y *H. incurva* durante 14 días en condiciones de laboratorio bajo UVR y en altos de N-NH₄⁺ (150 µM). También se realizó un experimento bifactorial 2 x 2 (2 tipos de radiación: PAR y PAB y 2 niveles de nutrientes: alta y baja disponibilidad de nutrientes) para *G. longissima* exclusivamente. También se realizó un experimento bifactorial para *Hydropuntia cornea*, pero lugar de en condiciones de laboratorio, se hizo a mesoescala (tanques de 90L y a una densidad 9 g PF L⁻¹) y bajo radiación solar filtrada (sin UVR, bajo invernadero) o con radiación solar. En este experimento se simulaban las condiciones de efluentes de piscifactoría modificando los flujos de N-NH₄⁺ creando condiciones de alta o baja disponibilidad de acuerdo a Gómez Pinchetti et al. (2011).

Las especies *H. cornea*, *G. longissima* y *H. incurva* en condiciones de laboratorio, mantuvieron altas tasas fotosintéticas (ETR_{max}), niveles altos de F_v/F_m, altos contenidos en compuestos de interés y un crecimiento de la biomasa, a excepción de *H. incurva*. La morfología, el color, las ramificaciones y el grosor, se vieron alterados determinando fuertemente la capacidad y la producción fotosintética. Altos niveles de UVR en el día 14 de experimento (final) causaron aumento en la irradiancia óptima (I_m) en las tres especies tal como se observó en otros estudios para macroalgas (Häder et al. 2001). Recientemente, se ha demostrado que dosis moderadas de UVA aumentan el crecimiento tanto de algas rojas, como de verdes y pardas (Xu and Gao 2016) así como la fijación fotosintética de CO₂ (Helbling 2003; Gao et al. 2007). La presencia de radiación UVB en este estudio, y en dosis moderadas, también produce un efecto positivo sobre la fotosíntesis de las especies estudiadas, tal como se ha reportado en macroalgas que habitan ambientes con altas dosis de UVR como en el Mediterráneo (Flores-Moya et al. 1999) o zonas tropicales (Hanelt & Roleda 2009). Las diferencias explicadas anteriormente para las especies de este estudio pueden ser igualmente demostradas por la relación ETR_{max}/NPQ_{max} donde *H. incurva* presentó valores más altos y menor disminución que en *H. cornea* y *G. longissima*. Las variaciones de ETR_{max}/NPQ_{max} con los cambios de UVR sugieren a este parámetro como un buen indicador de su efecto sobre las respuestas fotosintéticas, es decir, la relación entre la capacidad

fotosintética (o productividad de biomasa) y la disipación de energía (Figuerola et al. 2014). La relación C/N se redujo para las especies cultivadas en UVR. En estas especies, la UVR aumenta la acumulación de N y el potencial de crecimiento. Varios autores han propuesto que la acumulación de N sirve para la síntesis adicional de compuestos, como los fotoprotectores los cuales tienen pueden reducir los daños que esta radiación genera (Korbee et al. 2005; Huovinen et al. 2006; Figuerola et al. 2009).

En el experimento bifactorial para *G. longissima*, respecto al anterior experimento donde solo hubo un único nivel de nutrientes, podemos determinar los posibles efectos interactivos entre UVR y N-NH_4^+ sobre la productividad de compuestos bioactivos. En presencia de UVR y altos niveles de nutrientes, se estimuló el metabolismo secundario, manteniendo una alta producción fotosintética y mostrando cambios estructurales en los orgánulos a nivel celular. Bajo UVR, *G. longissima* mostró un engrosamiento de la pared celular y una excreción de polisacáridos que conforman una matriz extracelular (Schmidt et al. 2010). Esto pone de manifiesto que *G. longissima* presenta estrategias de defensa física frente a UVR, la cual prevendría de la penetración de dicha radiación (Hollós 2002). Este patrón probablemente también estimula la actividad bioquímica del aparato de Golgi induciendo a la formación de vesículas, las cuales contienen fibras que conformarían la matriz polimérica de la pared celular.

En la Tabla D.1, se recoge un resumen de los resultados en los diferentes experimentos sobre el ETR_{max} , la productividad de la biomasa y el crecimiento, comparando los valores de estas variables a los mismos tiempos de cultivo en experimentos de laboratorio (cilindro de 1.5 L) y mesoescala (tanques de 90 L). Se observa como en las condiciones de mesoescala, en *H. cornea*, la productividad fotosintética aumenta hasta 3-4 veces especialmente en los tratamientos con presencia de radiación solar (UVR+). Las diferencias en cuanto a productividad de la biomasa y crecimiento, fueron aún mayores en condiciones de mesocosmos. Estos resultados nos llevan a concluir que el conjunto de condiciones como el hidrodinamismo, la disponibilidad de nutrientes así como la fuente de radiación natural, favorecen el crecimiento de *H. cornea*. Los valores de producción están del orden e incluso algo mayores que los reportados previamente por Gómez-Pinchetti et al. (2011). Las productividad y tasas de crecimiento fueron algo mayores en *G. longissima* que en *H. cornea*, lo que confirma que es también un alga potencialmente cultivable y de un gran interés biotecnológico.

Tabla D.1. Producción fotosintética expresada como ETR_{max} ($\mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), productividad de la biomasa medida ($\text{g PS m}^{-2} \text{d}^{-1}$) y tasa de crecimiento en ($\% \text{d}^{-1}$) para *H. cornea* y *G. longissima* cultivada en laboratorio y a mesoescala. No se disponen de datos experimentales para estas variables durante la etapa de ficoprospección, al igual que no se disponen de datos experimentales del cultivo en mesocosmos para *G. longissima*.

Variable	Especie	Tiempo (días)	Radiación	Ficoprospección	Laboratorio	Mesoescala
ETR_{max} ($\mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	<i>Hc</i>	0	-	-	1.7 ± 0.4	5.5 ± 0.8
		8	UVR- UVR+	-	3.5 ± 0.8 3.2 ± 0.7	8.4 ± 0.7 9.9 ± 1
		14	UVR- UVR+	-	8 ± 0.2 3.5 ± 0.7	8.5 ± 1.2 10 ± 0.4
		0	-	-	1.4 ± 0.1	-
		8	UVR- UVR+	-	4.5 ± 0.2 6.5 ± 0.6	-
		14	UVR- UVR+	-	5.5 ± 0.4 7.2 ± 0.6	-
	<i>Gl</i>	0	-	-	-	-
		8	UVR- UVR+	-	9.3 ± 0.4 7.1 ± 0.1	80.2 ± 10.0 74.4 ± 4.3
		14	UVR- UVR+	-	4.4 ± 0.8 5 ± 0.1	40.0 ± 5.2 60.6 ± 7.6
		0	-	-	-	-
		8	UVR- UVR+	-	12.1 ± 1.1 17.1 ± 0.6	-
		14	UVR- UVR+	-	7.8 ± 0.1 7.9 ± 0.1	-
Productividad ($\text{g PS m}^{-2} \text{d}^{-1}$)	<i>Hc</i>	0	-	-	-	-
		8	UVR- UVR+	-	1.4 ± 0.2 1.7 ± 0	13.0 ± 1.3 11.0 ± 0.3
		14	UVR- UVR+	-	0.8 ± 0.2 1.1 ± 0	9.2 ± 0.6 10.9 ± 0.9
		0	-	-	-	-
		8	UVR- UVR+	-	2.6 ± 0.3 3.3 ± 0.2	-
		14	UVR- UVR+	-	1.5 ± 0 1.4 ± 0	-
	<i>Gl</i>	0	-	-	-	-
		8	UVR- UVR+	-	2.6 ± 0.3 3.3 ± 0.2	-
		14	UVR- UVR+	-	1.5 ± 0 1.4 ± 0	-
		0	-	-	-	-
		8	UVR- UVR+	-	2.6 ± 0.3 3.3 ± 0.2	-
		14	UVR- UVR+	-	1.5 ± 0 1.4 ± 0	-
Crecimiento ($\% \text{d}^{-1}$)	<i>Hc</i>	0	-	-	-	-
		8	UVR- UVR+	-	2.6 ± 0.3 3.3 ± 0.2	-
		14	UVR- UVR+	-	1.5 ± 0 1.4 ± 0	-
		0	-	-	-	-
		8	UVR- UVR+	-	2.6 ± 0.3 3.3 ± 0.2	-
		14	UVR- UVR+	-	1.5 ± 0 1.4 ± 0	-
	<i>Gl</i>	0	-	-	-	-
		8	UVR- UVR+	-	2.6 ± 0.3 3.3 ± 0.2	-
		14	UVR- UVR+	-	1.5 ± 0 1.4 ± 0	-
		0	-	-	-	-
		8	UVR- UVR+	-	2.6 ± 0.3 3.3 ± 0.2	-
		14	UVR- UVR+	-	1.5 ± 0 1.4 ± 0	-

H. cornea modificó su morfología, indicando una amplia plasticidad fenotípica, lo cual nos da una idea de la capacidad adaptación que posee para ocupar un rango amplio de medios físicos y bióticos. Estos cambios pueden ser fácilmente apreciados para esta especie en función del aporte de nutrientes, la cantidad y la calidad espectral a la que sea sometida. Uno de los cambios morfológicos con mayor implicación funcional es el aumento de relación Superficie/Volumen (S/V) lo que permite una mayor incorporación de nutrientes o captación de radiación en periodos de escasez (aumentando y alargando las ramificaciones) o reduciendo la relación C/N por disminución de densidad y grosor de las ramificaciones en periodos de alta irradiancia. También, debido a encontrarse libres en la columna de agua, van adquiriendo morfologías más esféricas (ballforming) debido al movimiento de turbulencia que provoca la aireación. Así consiguen aumentar la capacidad de incorporación de nutrientes tal y

como se ha observado anteriormente en otras especies (Figuerola et al. 2008; Mata et al. 2010). Además de la diferente composición bioquímica la cual proporciona diferentes propiedades alimenticias o cosmeceúticas, la diferencia en la coloración de la especie (por efecto del contenido pigmentario) esto puede ser explotado en el ámbito de la gastronomía para la oferta de recetas atractivas y creativas. La empresa Acadian Seaplants Limited (Canadá), comercializa algas frescas de la especie *Chondrus crispus* con distinta pigmentación, lo que consideran un atractivo gastronómico.

Los resultados mostraron que *H. cornea* puede actuar como un eficiente organismo biofiltrador de efluentes nitrogenados (N-NH_4^+) con valores de NUE de hasta el 99% a un flujo de NH_4^+ de 24 L h^{-1} . La evolución que siguió esta especie durante el experimento, a pesar de seguir disponiendo de la misma cantidad de N entrante, fue una disminución de la tasa de eliminación. Esto pone de manifiesto que la estrategia nutritiva que sigue esta especie, es la captación de N en periodos donde no hay disponibilidad para acumularlo probablemente en forma de metabolitos que actúen como reservorio. El rendimiento máximo de N (productividad de N), como otro parámetro para evaluar la capacidad biofiltradora, en *H. cornea* fue de $2 \text{ g N m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ para los tratamientos con HN. Estas cantidades son superiores a otras especies estudiadas: *Ulva rigida* ($1.4 \text{ g N m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) (Mata and Santos 2003), *Ulva lactuca* ($0.5 \text{ g N m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) (Figuerola et al. 2009), *Gracilaria conferta* ($0.8 \text{ g N m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) (Figuerola et al. 2010), pero inferiores a otras especies que también suscitan interés como biofiltros tal como *Asparagopsis armata* ($2.7\text{-}5.9 \text{ g N m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) (Schuenhoff et al. 2006). Gómez-Pinchetti et al. (2002), reportaron valores mucho más altos, para *H. cornea*, crecida en efluentes de estanques de peces en tanques de 1000 L y 0.8 m de diámetro: $10.1 \text{ g N m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ (algas cultivadas bajo radiación solar) y $6.1 \text{ g N m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ (algas cultivadas en invernadero sin UVR).

La productividad de la biomasa fue determinada mediante el pesaje de las algas, por lo que por primera vez y en esta Tesis Doctoral, hemos aplicado una metodología ya reportada en microalgas (Jerez et al. 2016) para estimar la productividad de la biomasa a partir de la tasa fotosintética expresada como tasa de transporte electrónico (ETR) a partir de las medidas de fluorescencia *in vivo* de la clorofila *a* asociada al PSII. La productividad de la biomasa estimada (eBP) a partir de ETR_{max} en un ciclo diario mostró una relación lineal, estadísticamente significativa, con la productividad de la biomasa medida (mBP). En este caso, la productividad estimada de biomasa fue cercana a los valores medidos, siendo sólo 58 y 54% menor. Esta subestimación hallada, concuerda con los resultados encontrados por Jerez et al. (2016) en *Chlorella vulgaris* cultivada a baja densidad ($< 1.5 \text{ g PF L}^{-1}$), donde se observó una pendiente de 0.42. Por el contrario, un aumento en la linealidad y una relación más cercana a la relación 1:1 ha sido demostrada en cultivos de alta densidad, lo que indicaría que los procesos fotosintéticos en *H. cornea* se mantuvieron estrechamente vinculados a la productividad de biomasa como Jerez et al. (2016) interpretó en el estudio de *Chlorella fusca*. Los resultados encontrados para *H. cornea* indican, por tanto, un acoplamiento entre la fotosíntesis (ETR) y productividad de la biomasa ($\text{g PS m}^{-2} \text{ d}^{-1}$)

(Falkowski and Raven 2013) aunque matizando que se pueden dar varias interpretaciones para explicar la baja correlación entre la productividad estimada y medida. La más aceptada podría ser explicada a través de la disminución significativa de la actividad fotosintética en respuesta a las altas irradiancias pudiendo conllevar posibles daños en el PSII, lo que conduciría a procesos alternativos en el ciclo de electrones. Estos podrían inducir un desacoplamiento entre el PSII y la evolución neta del O₂ y mayor contribución de la reacción Mehler asociada al PSI (Kromkamp et al. 2009; Ralph et al. 2010; Jerez et al. 2016).

2. Compuestos bioactivos

De los experimentos realizados tanto en el laboratorio como a mesoescala, se demuestra que existió un efecto interactivo de UVR y de los nutrientes sobre la acumulación de compuestos del metabolismo primario (proteínas, lípidos y carbohidratos) así como del metabolismo secundario (ficobiliproteínas, compuestos fenólicos y MAAs).

Los compuestos primarios (Tabla D.2) alcanzan valores más altos en las algas cultivadas tanto en el laboratorio como a mesoescala (90 L) respecto a las algas recolectadas (*G. longissima* recolectada de los esteros de la bahía de Cádiz y *H. cornea* o cultivadas en tanques de mantenimiento de 1000 L en BEA). Al comparar los datos de laboratorio y mesoescala se observa que en *H. cornea*, los contenidos de proteínas y lípidos son más altos en algas cultivadas en el laboratorio que a mesoescala, sin embargo, con los niveles de carbohidratos ocurrió justo lo contrario. Probablemente, la mayor actividad fotosintética (mayores tasas de crecimiento), conlleva a una acumulación de compuestos carbonados y componentes celulares de la pared celular constituida por polisacáridos del tipo agar.

Tabla D.2. Contenido en proteínas, lípidos y carbohidratos expresados en % de PS en la biomasa para *H. cornea* y *G. longissima* durante el periodo de ficoprospección (*G. longissima* recolectada de los esteros de la bahía de Cádiz y *H. cornea* o cultivadas en tanques de mantenimiento de 1000 L en BEA), y en condiciones del cultivo experimentales en laboratorio y a mesoescala. No se disponen de datos experimentales del cultivo en mesocosmos para *G. longissima*.

Variable	Especie	Tiempo (días)	Radiación	Ficoprospección	Laboratorio	Mesoescala
Proteínas (%)	<i>Hc</i>	0	-	6.73 ± 0.29	19.4 ± 1.7	9.6 ± 0.2
		8	UVR- UVR+		15.7 ± 1.4	13.6 ± 0.9
		14	UVR- UVR+		16 ± 1.7	15.2 ± 1.6
		0	-		17.2 ± 1.4	14.1 ± 1.5
		8	UVR- UVR+		14.1 ± 1	13 ± 0.6
		14	UVR- UVR+		16.4 ± 0.6	-
	<i>Gl</i>	0	-	7.14 ± 0.17	15.1 ± 0.4	-
		8	UVR- UVR+		17.6 ± 2	-
		14	UVR- UVR+		14 ± 1	-
		0	-		14.4 ± 0.6	-
		8	UVR- UVR+		5.2 ± 1	2.9 ± 0.7
		14	UVR- UVR+		7.5 ± 0.3	3.6 ± 0.5
Lípidos (%)	<i>Hc</i>	8	UVR- UVR+	1.7 ± 0.7	7.9 ± 0.8	3.5 ± 0.3
		14	UVR- UVR+		7.2 ± 0.3	2.7 ± 0.3
		0	-		11.1 ± 0.8	1.7 ± 0.5
		8	UVR- UVR+		4.4 ± 0.4	-
		14	UVR- UVR+		7 ± 0.5	-
		0	-		6.9 ± 0.3	-
	<i>Gl</i>	8	UVR- UVR+	5.6 ± 1.2	6.9 ± 0.9	-
		14	UVR- UVR+		10 ± 0.8	-
		0	-		19 ± 1	40.4 ± 2.2
		8	UVR- UVR+		13.1 ± 3.5	26.7 ± 2.4
		14	UVR- UVR+		28.3 ± 2.4	28 ± 2.8
		0	-		21.3 ± 1.8	36.3 ± 2.8
Carbohidratos (%)	<i>Hc</i>	8	UVR- UVR+	8.2 ± 2.4	28.5 ± 1.5	45.2 ± 9.6
		14	UVR- UVR+		18 ± 0.8	-
		0	-		19.8 ± 2.6	-
		8	UVR- UVR+		12.7 ± 2	-
		14	UVR- UVR+		36.5 ± 2.3	-
		0	-		35.1 ± 1.8	-

En el caso de los compuestos relacionados con el metabolismo secundario (ficobiliproteínas, compuestos fenólicos y MAAs), los contenidos fueron mucho más altos en algas cultivadas en el laboratorio o a mesoescala que en algas recolectadas (Tabla D.3). A su vez, los contenidos de compuestos bioactivos fueron mayores en los cultivos a mesoescala que en los del laboratorio, al contrario que ocurrió con el contenido en proteínas y lípidos.

Tabla D.3. Contenido de aminoácidos tipo micospolina (MAAs), compuestos fenólicos y ficobiliproteínas expresados en (mg g⁻¹ PS) y capacidad antioxidante (μmol TEAC g⁻¹ PS) para *H. cornea* y *G. longissima* durante el periodo de ficoprospección (*G. longissima* recolectada de los esteros de la bahía de Cádiz y *H. cornea* o cultivadas en tanques de mantenimiento de 1000 L en BEA), y en condiciones del cultivo experimentales en laboratorio y a mesoescala. No se disponen de datos experimentales del cultivo en mesocosmos para *G. longissima*.

Variable	Especie	Tiempo (días)	Radiación	Ficoprospección	Laboratorio	Mesoescala
MAAs (mg g ⁻¹ PS)	<i>Hc</i>	0	-	0.32 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.3 ± 0.0
		8	UVR- UVR+		0.2 ± 0.0	0.5 ± 0.1
		14	UVR- UVR+		0.8 ± 0.1	1.1 ± 0.2
		0	-		0.1 ± 0.0	1.4 ± 0.2
		8	UVR- UVR+		0.5 ± 0.1	3 ± 0.5
		14	UVR- UVR+		0.3 ± 0.1	
	<i>Gl</i>	0	-	0.19 ± 0.05	0.3 ± 0.1	
		8	UVR- UVR+		0.5 ± 0.0	
		14	UVR- UVR+		1.6 ± 0.1	
		0	-		0.3 ± 0.0	
		8	UVR- UVR+		0.7 ± 0.0	
		14	UVR- UVR+			
Compuestos fenólicos (mg g ⁻¹ PS)	<i>Hc</i>	0	-	2.3 ± 0	12.4 ± 0.5	13.5 ± 0.9
		8	UVR- UVR+		13.2 ± 1.1	26.8 ± 2.1
		14	UVR- UVR+		18.9 ± 0.7	34.8 ± 1.4
		0	-		13.3 ± 0.8	36.2 ± 1.4
		8	UVR- UVR+		13.7 ± 0.2	37 ± 3.3
		14	UVR- UVR+			
	<i>Gl</i>	0	-	1.2 ± 0	7.4 ± 0.2	
		8	UVR- UVR+		10.5 ± 0.9	
		14	UVR- UVR+		12.8 ± 0.3	
		0	-		10.7 ± 0.3	
		8	UVR- UVR+		10.1 ± 0.5	
		14	UVR- UVR+			
Ficobiliproteínas (mg g ⁻¹ PS)	<i>Hc</i>	0	-	1.3 ± 0.3	1.1 ± 0.2	1.7 ± 0.7
		8	UVR- UVR+		1.0 ± 0.1	1.9 ± 0.8
		14	UVR- UVR+		0.8 ± 0.1	3.2 ± 1.6
		0	-		1.9 ± 0.1	2.9 ± 0.5
		8	UVR- UVR+		1.2 ± 0.2	5.4 ± 1
		14	UVR- UVR+			
	<i>Gl</i>	0	-	2.6 ± 0.3	4.7 ± 0.4	
		8	UVR- UVR+		3.0 ± 0.3	
		14	UVR- UVR+		2.1 ± 0.2	
		0	-		3.2 ± 0.2	
		8	UVR- UVR+		3.4 ± 0.2	
		14	UVR- UVR+			
Antioxidantes (μmol TEAC g ⁻¹ PS)	<i>Hc</i>	0	-	14.6 ± 0.1	29.8 ± 0.9	10.4 ± 0.8
		8	UVR- UVR+		33 ± 1.1	49.1 ± 4.5
		14	UVR- UVR+		62.9 ± 1.7	42.4 ± 5.3
		0	-		36.7 ± 1.3	44 ± 2.3
		8	UVR- UVR+		42.2 ± 0.4	58.6 ± 1.9
		14	UVR- UVR+			
	<i>Gl</i>	0	-	11.7 ± 0.5	20.7 ± 0.8	
		8	UVR- UVR+		29.7 ± 0.7	
		14	UVR- UVR+		36.6 ± 1.5	
		0	-		30.1 ± 0.9	
		8	UVR- UVR+		30.6 ± 0.5	
		14	UVR- UVR+			

El mayor contenido de compuestos bioactivos en cultivos a mesoescala que en laboratorio rindió una mayor actividad antioxidante la cual fue también mayor que el de las algas recolectadas del

medio natural (Tabla), excepto en *H. cornea* a los 8 días de cultivo que fue mayor en algas cultivadas que en el laboratorio.

El contenido de MAAs totales, para el experimento en laboratorio, se incrementó considerablemente para todas las especies bajo UVR, con respecto a las condiciones iniciales alcanzando los valores máximos en las especies el octavo día del experimento (+83% en *H. cornea*, +55% en *G. longissima* y 70% en *H. incurva*). Además, el contenido de MAAs se correlacionó significativamente con la capacidad antioxidante. Por lo tanto, además de la capacidad fotoprotectora, los MAAs también estarían actuando como potenciales antioxidantes en estas especies.

Los compuestos fenólicos también se correlacionaron con el contenido en MAAs para *H. cornea* y *G. longissima*. Esto podría explicar la aclimatación efectiva al aumento de la UVR en el tratamiento bajo UVR, tal como ha sido reportado por otros autores (Rice-Evans et al. 1997; Karsten et al. 2009). Los compuestos fenólicos acumulados bajo un alto disponibilidad de nutrientes, pueden proteger a las algas contra la UVR. Estas dos especies mostraron una correlación positiva con el contenido de Palythine ($r = 0.88$ y 0.76 ; $p < 0.00$) y Palythanol ($r = 0.80$ y 0.76 ; $p < 0.00$) en *H. cornea* y *G. longissima*, respectivamente, que se correlacionó con el aumento en el contenido fenólico. Solo en *G. longissima* se correlacionó el contenido de Asterina-330 ($r = 0.66$; $p < 0.00$) con los compuestos fenólicos. En *H. incurva*, no se encontró correlación significativa a pesar de poseer gran cantidad de compuestos fenólicos (Güenaga 2011). Estas correlaciones entre compuestos fenólicos y MAAs se explicarían a través de la ruta biosintética de ambos grupos de compuestos (ruta del ácido shikímico), donde compartirían algún sustrato común el cual es inducido bajo UVR y los nutrientes. En algas pardas, por ejemplo, se ha demostrado que los compuestos fenólicos se acumulan y fotoprotegen el aparato fotosintético (Cerantola et al. 2006).

Respecto a la composición de fotoprotectores y capacidad antioxidante en *G. longissima*, en el experimento bifactorial, se observó una interacción significativa entre la UVR y la disponibilidad de nutrientes en la acumulación de proteínas, MAAs y compuestos fenólicos. Los MAAs totales en *G. longissima* aumentaron interactivamente bajo UVR y en alta disponibilidad de nutrientes (65% respecto a los otros tratamientos). El contenido de ficobiliproteínas aumentó significativamente en tratamientos con alta disponibilidad de nutrientes independientemente de la luz (PAB o PAR). Las ficobiliproteínas también ejercen un rol fotoprotector en *G. longissima*, por lo que se ven influencias por UVR (Boulay et al. 2008). Estos pigmentos no fueron degradados bajo UVR en condiciones de alto disponibilidad de nutrientes. Sin embargo, en baja disponibilidad de nutrientes, el contenido de ficobiliproteínas sí se redujo significativamente. Este mismo patrón se observó en *Porphyra* sp. en un experimento similar (Korbee et al. 2004b).

Los compuestos fenólicos, en presencia de UVR, tanto en alta como en baja disponibilidad de nutrientes, fueron mayores a los encontrados bajo PAR. Estos resultados respecto al contenido de compuestos fenólicos, concuerdan con los resultados por Qu et al. (2014), donde encontraron compuestos nitrogenados bromofenólicos en *Osmundaria colensoi* y *Rhodomela confervoides*, los cuales parecen ser estimulados por UVR y por la disponibilidad de N en el medio, lo cual apuntaría a que también, estos metabolitos, tendrían un rol como reservorio de N celular (Qu et al. 2014), al igual que otras moléculas como los MAAs (Korbee et al. 2004b).

En el estudio bifactorial y a mesoescala, en *H. cornea*, se observó que la eficiencia de incorporación de nitrógeno (NUE %) máxima se alcanzó en los cultivos en el exterior, en los que también se encontró una mayor concentración de MAAs, con respecto a los cultivos que se situaron en el interior. Este resultado sugiere que a un flujo alto de $N-NH_4^+$ de $150 \mu M h^{-1}$, el N disponible en el medio, procedente de los efluentes, se emplea preferentemente en la síntesis de MAAs, coincidiendo con lo observado por Figueroa et al. (2012). Esto, unido a que la concentración de Chla y ficobiliproteínas también es mayor en las algas cultivadas en presencia de UVR, puede ser indicativo de que esta radiación estimule la movilización del N disponible en el medio hacia la síntesis de compuestos nitrogenados. Es interesante destacar que solo resultó afectada la ficobiliproteína más externa del ficobilisoma, la ficoeritrina. Esto demuestra en *H. cornea* que este pigmento accesorio puede ser desacoplado del complejo supramolecular para formar agregados en el citoplasma que servirían de reservorio de N (Talarico and Maranzana 2000). De esta forma, cuando *H. cornea* se encuentra bajo limitación de este nutriente, se produce la degradación de los ficobilisomas empleándose el N contenido en otras prioridades celulares (Aráoz and Häder 1997). De lo contrario, bajos niveles de N en el cultivo reducen el contenido pigmentario de Chla y ficobiliproteínas (Beardall et al. 1991; Wulff et al. 2000). La proteólisis de las ficobiliproteínas, que puede representar el 17.3% de las proteínas solubles de las algas rojas (Hernández et al. 1993), proporciona a las células los aminoácidos necesarios para el metabolismo principal. Cuando los organismos son privados de un nutriente esencial, los ficobilisomas se degradan específicamente (Aráoz and Häder 1997). Así pues, tanto en *H. cornea* como en otras algas rojas y cianobacterias, las ficobiliproteínas tienen dos funciones principales, servir de pigmento accesorio al cloroplasto para aumentar la capacidad de absorción espectral, y como proteínas de almacenamiento (reservorio de N). En concreto, las ficobiliproteínas del orden Gracilariales, en el cual se incluye *H. cornea*, representan una gran reserva de N y muchos estudios han demostrado que sus concentraciones están correlacionadas positivamente con la disponibilidad de N (Lapointe 1981; Lapointe and Duke 1984; Vergara et al. 1995; Jones et al. 1996). Además, es necesario destacar que Vergara et al. (1995) demostraron que la síntesis de ficobiliproteínas es estimulada preferentemente con respecto a la síntesis de otras proteínas, en respuesta pulsos de N en *Gracilariopsis lemaneiformis* (Zubia et al. 2014).

En condiciones de radiación UV y alta disponibilidad de N-NH_4^+ , *H. cornea* presentó una alta acumulación de compuestos bioactivos de interés tanto nitrogenados: aminoácidos tipo micosporina, como carbonados: ácidos grasos poliinsaturados (Omega-6) y compuestos fenólicos. Por otro lado la mayor acumulación de proteínas, pigmentos fotosintéticos (clorofila, carotenoides y ficobiliproteínas), ácidos grasos poliinsaturados (Omega-3) y actividad antioxidante, se produjo en altos niveles de N-NH_4^+ pero en ausencia de UVR. Finalmente el nivel más alto de lípidos y carbohidratos se alcanzó en presencia de UVR pero con baja disponibilidad de N. El contenido más alto de MAAs totales (mg g^{-1} PS), se alcanzó tras 35 días de cultivo en alta disponibilidad de N-NH_4^+ , produciéndose un incremento de 16 veces (hasta 5 mg MAAs g^{-1} PS) con respecto a los valores iniciales. La productividad de MAAs ($\text{mg MAAs m}^{-2} \text{ d}^{-1}$), aumentó en todos los tratamientos con el tiempo, logrando valores máximos a los 28 días de cultivo ($237 \text{ mg MAAs m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) para el tratamiento con alto N-NH_4^+ en presencia de UVR (bajo radiación solar), siendo éste el mayor de los valores reportados en la bibliografía sobre productividad de MAAs en algas cultivadas (Figueroa et al. 2008, 2010, 2012; Barceló-Villalobos et al. 2017). El contenido de ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs) y de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), aumentaron un 77 y 93% de promedio, respectivamente en todos los tratamientos respecto a los contenidos iniciales, reduciéndose así el contenido en ácidos grasos saturados (AGS) en un 55%.

A los 7 días de cultivo, para *H. cornea* dentro del invernadero (sin UVR), la proporción Omega-6/Omega-3 de la biomasa algal fue 3.2-3.4, mientras que en el exterior (con UVR solar) fue de 1.4-7.3. Los valores óptimos recomendados para la proporción Omega-6/Omega-3 en una dieta saludable son de 1-2 (Simopoulos 2002, 2016). Así pues, una proporción de 2.5 reduce la proliferación de células cancerosas en el colon y la proporción 2-3 reduce los procesos de inflamación en pacientes con artritis reumatoides, mientras que valores de 5 tienen efectos positivos en pacientes con asma (Simopoulos 2002). Las microalgas se encuentran entre los organismos con alto contenido de ácidos grasos Omega-3, tanto o incluso más que el aceite de lino, las semillas de chía, el cacahuete y las avellanas (Conchillo et al. 2006; Simopoulos 2016). En medidas realizadas en la unidad de Fotobiología del SCAI (UMA), se han determinado proporciones muy favorables en Omega-6/Omega-3 en distintas microalgas como *Scenedesmus almeriensis* (1.7), *Isochrysis galbana* (0.65), *Nannochloropsis gaditana* (1.07) y *Tetraselmis suecica* (0.53), crecidas en las Instalaciones de Las Palmerillas (Fundación Caja Mar) bajo la supervisión del Dr. Gabriel Acien (datos no publicados). La OMS recomienda la ingesta diaria de 0.3-0.5 g de Omega-3 por día mientras que la Sociedad española de nutrición recomienda el consumo diario de 1-2 g día (Kris-Etherton et al. 2003). El Omega-3 tiene efectos beneficiosos en la función visual, cognitiva, disminuye la presión arterial y previene alergias y enfermedades autoinmunes (Calder 2015). Por lo tanto, bajo ciertas condiciones de cultivo, la biomasa de *H. cornea* adquiere características como alimento funcional relacionada con los ácidos grasos a pesar de que el contenido en lípidos totales no sea tan alto (3.6% como máximo) como el de microalgas, las cuales tienen un contenido promedio del 30%, aunque hay especies que alcanzan niveles del 60-

70% (Sharma et al. 2012; Batista et al. 2013). Los niveles de lípidos totales fueron mucho más altos en *G. longissima* que en *H. cornea*, alcanzando valores de hasta de un 11% tras 14 días de cultivo bajo UVR (Tabla D.2). Se conoce que la radiación UVA promueve la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) del 37.3% al 41.3% (Liang et al. 2006) ya que estos son sensibles a la oxidación inducida por UVR por lo que si la radiación aumentase, se induciría la síntesis de estos ácidos grasos (Stabili et al. 2012). Aunque en esta Tesis Doctoral no se hizo el perfil de ácidos grasos, de acuerdo a Stabili et al. (2012), en *G. longissima* los PUFAs se encuentran en altas concentraciones. Así pues, *G. longissima* se presentaría como un alga comestible, con un perfil idóneo de ácidos grasos y con buen contenido en proteínas, ficobiliproteínas y MAAs entre otros.

3. Aplicaciones cosmecéuticas: toxicidad, inmunoestimulantes, antioxidantes y fotoprotección para los extractos de *H. cornea*

Al ser las especies *H. cornea* y *G. longissima* las que presentaron mayor actividad antioxidante en el estudio de ficoprospección relacionado con su contenido en MAAs y compuestos fenólicos como también han reportado otros autores (Kladi et al. 2004; Figueroa et al. 2012) se realizó un estudio de citotoxicidad para evaluar la bioseguridad de los extractos para un uso posterior en aplicaciones cosméticas. Los extractos no fueron tóxicos para células humanas relacionadas con la piel: fibroblastos gingivales (HGF) y queratinocitos inmortales humanos (HaCaT) (Tabla D.4). Resultados similares, se encontraron estudiando los MAAs Shinorine, Porphyrin-334 y Micosporine-glycine los cuales, de forma aislada, redujeron significativamente la viabilidad celular en esta misma línea celular HaCaT en diferentes proporciones a concentraciones de 0.1 mg mL⁻¹ y superiores (Choi et al. 2015). También, Fernandes et al. (2015) encontraron que el aminoácido Micosporine-Glycine inmovilizado sobre un biofilm de quitosano inducía la proliferación celular en otra línea celular dérmica (fibroblastos murinos L-929) Por lo tanto, los MAAs que se encuentra presentes en *H. cornea* y *G. longissima* (4.8 y 1.62 mg MAAs g⁻¹ PS cuantificados en los experimentos de esta Tesis Doctoral) demuestran poseer efectos sobre la proliferación celular tal como reportaron Choi et al. (2015). En otro experimento *in vitro* donde se expusieron fibroblastos a radiación UVA, observaron que la aplicación de Porphyrin-334 a concentraciones de 10-40 µM en las células también impedía la reducción de la viabilidad celular (Ryu et al. 2014), Por lo tanto, la aplicación de MAAs después de la exposición a UVR, contribuye a una mayor viabilidad celular en comparación con el control.

Tabla D.4. Citotoxicidad de los extractos y capacidad inmunomoduladora para los extractos acuosos de *H. cornea*. Capacidad antioxidante y parámetros fotoprotectores (método COLIPA 2011) de preparado cosmético el cual contiene extracto de *H. cornea*, extracto comercial de *Ginko biloba*, aceite de Karanja (*Pongamia pinnata*) y Vitaminas C y E entre otros.

Crema con filtros biológicos (F _{bi})		
¹ Citotoxicidad (EC ₅₀ mg mL ⁻¹)	Línea celular HaCaT	259.5*
	Línea celular HGF	250.7*
Inmunestimulación	TNF- α	+++
	IL-6	++
² Capacidad antioxidante	ABTS	10.9
Fotoprotección	FPS (290-400 nm)	15
	UVA _{FPS} (290-320 nm)	4.3
	FPS/UVA _{FPS}	3.4
	FAPEB _{UVA} (320-400 nm)	13.7
	FAPEB _{UVB} (290-320 nm)	9.9
	λ crítica (nm)	385

¹La citotoxicidad fue evaluada para el extracto crudo y no para el preparado cosmético.

²Capacidad antioxidante expresada en μ mol TEAC g⁻¹ PS.

Una vez demostrada que los extractos no producen citotoxicidad, se evaluó la capacidad inmunoestimuladora de los extractos acuosos de *G. longissima* y *H. cornea*. Los extractos estimularon la producción de citoquinas tanto de TNF- α como IL-6 en macrófagos de la línea celular RAW 264.7 (Tabla D.4). Se conoce que las algas marinas son fuente natural de compuestos químicos con propiedades antiinflamatorias atribuidas a una gran diversidad de metabolitos de distinta naturaleza (Fernando et al. 2016). Otros estudios han demostrado, que los extractos de algas incrementan la fagocidad y la actividad de secreción de los macrófagos (Yoon et al. 2009; Yang et al. 2012). Extractos del alga roja *Porphyra yezoensis* indujeron la producción de TNF- α *in vitro* e *in vivo* en macrófagos murinos (Yoshizawa et al. 1995). Entre la sustancias con capacidad inmunoestimuladora, destacan los polisacáridos ácidos (Kim et al. 2015). Los polisacáridos ácidos de *Halopithys incurva* inducen la producción de IL-6 y de óxido nítrico (Abdala et al. 2011) mientras que los de la microalga roja, *Porphyridium cruentum*, inducen tanto TNF- α como IL-6 en macrófagos de la línea celular RAW 264.7 (Abdala-Díaz et al. 2010). De manera similar, otros estudios con algas rojas de la familia Gracilariaceae, en concreto, *Gracilaria verrucosa* (heterotipo de *Gracilariopsis longissima* en este estudio de acuerdo a Steentoft et al. (1995), indican que son inhibidores de la producción de mediadores proinflamatorios (NO, IL-6 y TNF- α) (Dang et al. 2008) debido a la bioactividad que ejercen dos ácidos grasos (C9 y C10).

Los productos biotecnológicos de más alto valor añadido obtenidos mediante sistemas de cultivo IMTA, a partir de las especies estudiadas en esta Tesis Doctoral, podrían redirigirse para suplir las demandas de compuestos fotoprotectores de la industria cosmética (Figuerola et al. 2011). En los últimos años, la mayoría de las empresas cosméticas han lanzado productos cosmeceúticos los cuales

contienen fotoprotectores solares, cremas hidratantes, antioxidantes o una combinación de los tres y que aportan, además, ingredientes bioactivos capaces de mejorar las funciones celulares relacionadas con la defensa antioxidante entre otros efectos biológicos (Mufti 2003; Baran and Maibach 2017; Jahan et al. 2017). En esta última parte de esta Tesis Doctoral, se elaboraron 8 productos cosméticos con la finalidad de evaluar la capacidad fotoprotectora que otorga el extracto de *H. cornea* y otros componentes de origen natural. Todos los preparados cosméticos contuvieron los componentes básicos, más los componentes fotoprotectores (filtros UVR) y antioxidantes

Primeramente, se encontró que el extracto de *H. cornea*, sin ser vehiculizado en ningún preparado cosmético, demostró por si solo una alta capacidad de absorción de UVR cuando se aplicó en una placa de polimetilmetacrilato a una concentración de 13.9 mg de PS de alga cm⁻² (80 % de UVB, 86 % de UVA-II y 56 % de UVA-I). Esta alta absorción debe estar asociada a su contenido en moléculas fotoprotectoras: MAAs totales (hasta 5 ± 1.8 mg MAAs g⁻¹ PS) (datos de esta Tesis Doctoral), al contenido en ficobiliproteínas (ficocianinas + ficoeritrinas) las cuales otorgan al extracto el “color rosado” (hasta 1.2 mg FC g⁻¹ PS y 5.3 mg FE g⁻¹ PS), además de por el alto contenido fenólico (hasta 95 ± 26 mg g⁻¹ PS). El valor funcional de los preparados cosméticos elaborados en este estudio, no solo depende de su Factor de Protección Solar (FPS) sino también de su capacidad antioxidante la cual permita eliminar los radicales libres que la UVR genera en la piel. Las cremas con mayor capacidad antioxidante fueron aquellas que contenían todos los componentes fotoprotectores y bioactivos descritos en la formulación, aunque sus valores no se incrementaron de forma lineal debido a las interferencias o sinergias negativas que puedan darse entre los diferentes componentes. El segundo preparado cosmético que más actividad antioxidante demostró fue, el que contenía extractos de *H. cornea* (15 % del total de la crema) y extracto de *G. biloba* (5 % del total de la crema) además de aceite de Karanja. Estos tres componentes añadidos a un producto cosmético, aumentan la capacidad antioxidante respecto a los valores basales.

La radiación UVA, en comparación con la UVB, puede penetrar más profundamente a través de la piel (Tuchinda et al. 2006) siendo principalmente responsable del fotoenvejecimiento y cáncer de piel (Sliney 2001, Young 2003). Es por esto por lo que los esfuerzos científicos actuales están dirigidos a la fotoprotección de estas longitudes de onda (UVA_{FPS}). De acuerdo a la literatura científica, un fotoprotector ideal sería aquel capaz de absorber/reflejar la energía procedente de UVA en un tercio respecto al intervalo de UVR total (290-400 nm), por lo tanto, los valores ideales de UVA_{FPS} serían de 1/3 del FPS (Osterwalder et al. 2014). En los productos elaborados en este capítulo, se obtuvieron estos valores de filtros biológicos (extracto de *H. cornea*, extracto de *G. biloba* y aceite de *P. pinnata*) (Tabla D.4). Aunque para la búsqueda de un producto cosmético dentro del encaje “cosmética natural” no es posible la adición de filtros químicos, y solo se permite la inclusión de filtros físicos o inorgánicos no

particulados (con limitación de cantidad en el producto) los cuales se asumen que proceden de fuentes minerales naturales (Kostyuk et al. 2017).

En esta última parte de esta Tesis doctoral, se propone usar como complemento a los clásicos parámetros fotoprotectores que vienen usándose desde hace décadas (FPS y UVA_{FPS}), los Factores de Protección Frente a Efectos Biológicos (FAPEB). Este nuevo parámetro ofrece una información más detallada sobre la fotoprotección frente a otros efectos biológicos inducidos por UVB y UVA (López-Figueroa et al. 2009). Si bien, el FPS (290–400 nm) solo tiene en cuenta para su cálculo el espectro de acción para la producción de eritema en la piel y el UVA_{FPS}, solo tiene en cuenta el espectro de acción para la pigmentación persistente, el FAPEB es propuesto en este estudio como un nuevo parámetro integrador de otros efectos biológicos tanto de UVB como de UVA (13 además de los dos empleados para el FPS y UVA_{FPS}) sobre patologías de la piel, ojos y a nivel molecular. Así pues, debido a la novedad que supone este nuevo parámetro, no existen valores estándar ideales como en el caso del FPS y UVA_{FPS}, los cuales sirvan como referencia para realizar comparativas entre productos o formulaciones. Los resultados que arrojan este estudio para las formulaciones propuestas, muestran los valores de FAPEB_{UVB} y FAPEB_{UVA} más altos en los preparados donde se mezclaron los filtros físicos y químicos, ya que ambos ofrecen absorción conjunta a cada intervalo espectral consiguiendo así un fotoprotector de amplio espectro (Osterwalder et al. 2014). También, la mezcla entre los filtros químicos y biológicos otorga al producto cosmético una alta fotoprotección frente a otros efectos biológicos. Para este nuevo parámetro fotoprotector, también se han logrado unos aceptables resultados cuando solamente se emplearon filtros biológicos en los preparados cosmético elaborados (extracto de *H. cornea*, extracto de *G. biloba* y aceite de *P. pinnata*). La amplia fotoprotección que otorgan las sinergias entre los metabolitos fotoprotectores contenidos en estas especies (Patil et al. 2015; Novza & Popova 2016; Cefali et al. 2016), consiguen obtener en un producto un amplio espectro de absorción tanto de FAPEB_{UVB} como de FAPEB_{UVA} que proteja de los efectos biológicos nocivos de esta radiación sobre la piel, ojos y nivel molecular (Almutawa et al. 2013). Además de las propiedades antioxidantes de los MAAs, en los últimos años han surgido otras propiedades biológicas interesantes de gran aplicabilidad en el ámbito cosmeceútico. El aminoácido Porphyr-334, encontrado en las especies estudiadas en esta Tesis Doctoral, protege contra la formación de dímeros de ADN lo cual contribuye a la reducción del daño del ADN debido a UVR (Misonou et al. 2003). De la Coba et al. (2009) también demostraron que Porphyr-334 más Shinorine contrarrestan los cambios bioquímicos en la piel de ratones albinos, expuesta a UVR al mantener la expresión de la proteína de choque térmico Hsp70, un biomarcador potencial de daño UV agudo. El aminoácido Porphyr-334 es quizás el que más potencialidad cosmeceútica presenta, puesto que previene el fotoenvejecimiento inhibiendo la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la metaloproteínasa en la piel, así como inductor de los componentes de la matriz extracelular (procolágeno, colágeno tipo I, elastina) y de la expresión proteica en fibroblastos humanos irradiados con UVA (Ryu et al. 2014). Hartmann et al. (2015)

investigaron el potencial de inhibición de la enzima colagenasa (responsable de la degradación del colágeno dérmico) a partir de MAAs aislados de algas rojas *Porphyra* sp. y *Palmaria palmata*. Choi et al. (2015), encontraron que los MAAs tienen efectos significativos en el proceso de cicatrización de heridas en queratinocitos humanos mediados por activación de quinasas de adhesión focal (FAK), quinasas reguladas por señal extracelular (ERK) y quinasas N-terminales c-Jun (JNK). Estos resultados sugieren que los MAA aceleran la reparación de heridas activando las vías de señalización FAK-MAPK. Este estudio también indica que los MAAs pueden actuar como un nuevo agente de curación de heridas y además sugiere que los MAAs podrían ser un biomaterial novedoso para las terapias de curación de heridas. Suh et al. (2014b), investigaron en la línea celular de fibroblastos humanos HaCaT, los niveles de expresión de genes asociados con la actividad antioxidante, la inflamación y el envejecimiento de la piel en respuesta a UVR. Además, en presencia de MAAs, los genes supresores de UVR, de procolágeno C (gen *PCOLCE*) y los genes que codifican para la biosíntesis de elastina, que están relacionados con el envejecimiento de la piel, mostraron mayores niveles de expresión incrementados iguales a los de las células tratadas con UVR. Por último, más recientemente, Becker et al. (2016) estudiaron el rol de los MAAs como agentes inmunomoduladores en defensa de las vías reguladoras que se activan en el área inflamada en células mielomonocíticas humanas (cáncer de sangre). Se estudió el efecto de los MAAs en las cascadas de señalización central, como la activación del factor nuclear de transcripción factor kappa b (NF- κ B), así como el metabolismo del triptófano. Los MAAs indujeron la actividad de NF- κ B por lo que las vías inflamatorias se ven afectadas por los MAAs, pero a pesar de la similitud estructural entre los distintos MAAs estudiados (*Porhyra*-334 y *Shinorine*), se observaron diversos efectos en la línea celular estudiada.

A largo plazo, el uso de filtros de protección solar de origen natural sería mucho más atractivo. Sin embargo, en este sentido, todavía hay mucha información escasa en la literatura científica (Cavinato et al. 2017). La conciencia cada vez mayor del consumidor de los peligros del sol y la toxicidad o fotoalergenicidad de alguno de los filtros químicos, ha influenciado la industria cosmética incrementando la producción e investigación de productos cosméticos fotoprotectores naturales. Es necesario abordar, que en la última década, se han hecho grandes esfuerzos por desarrollar filtros solares sin la necesidad de altas cantidades de productos químicos, ya que muchos de estos se han asociado con reacciones alérgicas o fototoxicidad (Kawakami and Gaspar 2015), baja fotoestabilidad y biodegradabilidad además de una falta de efectividad en la protección real de la piel (Kockler et al. 2012).

Las algas rojas y concretamente *Hydropuntia cornea* y *Gracilariopsis longissima* han demostrado en este estudio ser especies de una alta potencialidad para la obtención de compuestos de alto valor relacionado con la capacidad fotoprotectora, antioxidante e inmunoestimulante y su presentación en productos cosméticos fotoprotectores. Por otro lado son especies que se pueden

cultivar de forma vegetativa y bajo altos niveles de N-NH_4^+ lo que no sólo permite producir de forma efectiva biomasa a un coste menor sino que además pueden ser usadas como algas biofiltradoras depurando aguas residuales de piscifactorías lo que reduciría el impacto ambiental de estas instalaciones.

Conclusiones finales

1. La extracción de compuestos bioactivos de las especies algales *Gelidium corneum*, *Gelidium pusillum* (Stackhouse), *Porphyra umbilicalis*, *Halopithys incurva*, *Gracilariopsis longissima*, *Hydropuntia cornea*, *Ulva rotundata* y el líquen marino *Lichina pygmaea*, se ve favorecida por el empleo de solventes hidroalcohólicos y por temperaturas moderadas que no comprometan la integridad molecular.
2. Las dos especies para este estudio de ficoprospección con mayor capacidad antioxidante y moléculas con potencial interés biotecnológico, fueron *G. longissima* y *H. cornea*. *H. incurva*, es otra especie interesante debido al alto nivel de compuestos fenólicos.
3. Por primera vez, se describe en la literatura científica para *G. longissima* y *H. incurva*, un compuesto bromofenólico sulfatado (3-bromo-4,5-dihidroxifeniletanol sulfato: $C_8H_9BrO_6S$), con una masa atómica observada de 334.91954 (para ambas especies) y una masa atómica calculada de 334.91959 (ppm 0.1) y 334.96646 (ppm 0.06) para *G. longissima* y *H. incurva* respectivamente. Este bromofenol sulfatado ha sido descrito como sustancia anticancerígena (Liu et al. 2011) en varias líneas celulares humanas de cáncer HCT-8, Bel-7402, BGC-823, A549 y A2780 (Ma et al. 2006).
4. Se confirma que los métodos más generalizados para la evaluación de la capacidad antioxidante, estiman el contenido en antioxidantes dependiendo de la solubilidad del radical en los solventes empleados para la extracción. El método ABTS, presenta los valores más realistas debido a que por su naturaleza química posee la capacidad de solubilizarse tanto en la matriz hidrofílica como en la lipofílica.
5. Las algas rojas, *Gracilariopsis longissima*, *Hydropuntia cornea* y *Halopithys incurva* expuestas durante 14 días a UVR y a la adición de nutrientes de N y P en condiciones no limitantes, no manifiestan caídas en el rendimiento cuántico máximo (F_v/F_m) y presentan una aclimatación propia de plantas tipo-sol (incrementos de $E_{TR_{max}}$, NPQ_{max} y $E_{k_{ETR}}$). Las

variaciones de ETR_{max}/NPQ_{max} respecto a UVR, sugieren a este parámetro como un buen indicador de su efecto sobre las respuestas fotosintéticas, es decir, la relación entre la capacidad fotosintética (o productividad) y la disipación de energía reforzando la tesis descrita por Figueroa et al. (2014), para este parámetro.

6. La UVR, en condiciones de alta disponibilidad de nutrientes, promueve en las algas rojas, *Gracilariopsis longissima*, *Hydropuntia cornea* y *Halopithys incurva* la acumulación tanto de pigmentos fotosintéticos (clorofila *a*, carotenoides y ficobiliproteínas) como fotoprotectores (aminoácidos tipo micospolina y compuestos fenólicos) al mismo tiempo que incrementan la actividad antioxidante.
7. *G. longissima* presenta estrategias de defensa física frente a UVR y bajo alta disponibilidad de nutrientes, mediante el engrosamiento de la pared celular en células corticales. Este aumento del tamaño de la pared celular prevendría de la penetración de dicha radiación de acuerdo a las observaciones realizadas por otros autores (Hollosy 2002). Este patrón, probablemente, también estimula la actividad bioquímica del aparato de Golgi induciendo a la formación de vesículas, las cuales contienen fibras que conformarían la matriz polimérica de la pared celular de esta especie.
8. La clorofila *a* (Chl*a*), los carotenoides, los carbohidratos (como almidón), los lípidos, la capacidad antioxidante y la viabilidad celular, presentan una interacción significativa entre la UVR y el contenido de nutrientes. *G. longissima* mostró una alta aclimatación a UVR y a la alta disponibilidad de nutrientes sin mostrar disminución en la tasa fotosintética, aumentando la acumulación de compuestos de N con rol fotoprotector y antioxidante.
9. El cultivo intensivo de *H. cornea* a mesoescala (tanques de 90 L) durante 35 días y en un sistema de biofiltración con efluentes emulados de piscifactoría, transforma los nutrientes disueltos en biomasa rica en compuestos bioactivos. Los efectos interactivos de la radiación solar y el $N-NH_4^+$ repercutieron positivamente en la biofiltración (NUR y NUE %), en la productividad de biomasa ($g\ m^{-2}\ d^{-1}$), en la producción fotosintética (ETR_{max}) y en relación ETR_{max}/NPQ_{max} .
10. La productividad de la biomasa estimada (eBP) mostró una relación lineal significativa con la productividad de la biomasa medida (mBP) en *H. cornea* ($r = 0.61$; $p < 0.01$). La eBP fue próxima a los valores de mBP, siendo un 56% menor (respecto a la pendiente) en eBP que en mBP. Por lo tanto, los resultados encontrados para *H. cornea* indican un acoplamiento existente entre la fotosíntesis y la productividad de la biomasa, aunque matizando que se

pueden dar varias interpretaciones para explicar la baja correlación entre la productividad estimada y medida.

11. La mayor acumulación de compuestos del metabolismo del N se produce en cultivos con alta disponibilidad de este nutriente, pero se ven influidos de forma diferente por UVR. Los pigmentos fotosintéticos (Clorofila, ficobiliproteínas) así como las proteínas solubles se acumulan más sin UVR mientras que los fotoprotectores (MAAs y compuestos fenólicos) se acumulan más en presencia de UVR. Por otro lado los lípidos y carbohidratos se acumulan preferentemente en cultivos con limitación de N. Sin embargo los ácidos grasos poliinsaturados (Omega-3 y Omega-6) se acumulan preferentemente en condiciones de alta disponibilidad de nutrientes. La relación Omega-6/Omega-3 ($\omega 6/\omega 3$), fundamental para una correcta actuación de estos AG en la salud humana, alcanza valores próximos a 2, lo cual estaría dentro de la proporción considerada como óptima para una alimentación saludable.
12. La productividad de los MAAS en *H. cornea* bajo UVR y altos niveles de $N-NH_4^+$, alcanza valores de 200 mg MAAs $m^{-2} d^{-1}$ siendo los más altos reportados hasta la fecha. Los resultados positivos obtenidos en este estudio dejan abierta la posibilidad de realizar ensayos posteriores que permitan el diseño de un modelo más óptimo para el escalado del sistema con fines comerciales.
13. Para *H. cornea* cultivada en baja disponibilidad de nutrientes, se observó que la ficobiliproteína más externa del ficobilisoma (ficoeritrina) se ve afectada bajo estas condiciones, lo cual demuestra en *H. cornea*, que este pigmento puede ser desacoplado del complejo supramolecular (ficobilisoma) formando agregados en el citoplasma y sirviendo así de reservorio de N. De esta forma, cuando *H. cornea* se encuentra bajo limitación de este nutriente, se produce la degradación de los ficobilisomas empleándose el N contenido en estas moléculas para otras prioridades celulares
14. Los extractos de *Gracilariopsis longissima* y *Hydropuntia cornea* no provocan efectos citotóxicos sobre las líneas celulares, fibroblastos gingivales HGF y queratinocitos humanos inmortalizados (HaCaT) pero si en macrófagos murinos RAW 264.7.
15. Los extractos de *G. longissima* y *H. cornea* inducen activamente la producción de citoquinas en macrófagos murinos RAW 264.7. Estos extractos podrían considerarse para estudios y usos posteriores en productos nutraceuticos, cosméticos y farmacológicos potenciales que se aplicarían cuando fuese necesaria la activación de macrófagos en procesos inflamatorios. Los

extractos pueden estimular la respuesta inmune de las células mediante la inducción de la producción de las citoquinas TNF- α e IL-6.

16. El extracto de *H. cornea*, sin ser vehiculizado en ningún preparado cosmético, demostró por sí solo que tiene una alta capacidad de absorción de UVR (80% de UVB, 86% de UVA-II y 56% de UVA-I) cuando se aplica en una placa de polimetilmetacrilato (PMMA) emulando las propiedades fisicoquímicas de la piel y a una concentración de 13.9 mg de PS de alga cm⁻². Esta alta absorción se asocia a su contenido en moléculas fotoprotectoras (MAAs: 5 ± 1.8 mg MAAs g⁻¹ PS).
17. Se diseñó un filtro biológico basado en el extracto concentrado de *H. cornea*, extracto de *Ginkgo biloba* junto con aceite *P. pinnata* (karanja) y Vitaminas C y E, en un preparado cosmético compatible con la “cosmética natural”. Se alcanzan valores de fotoprotección prácticamente iguales a los perfiles ideales propuestos por la literatura científica: FPS de 15, longitud de onda crítica de 386 nm y UVA_{FPS} de 4.3 además de mostrar una alta capacidad antioxidante (10.8 μ mol TEAC g⁻¹ crema) y altos valores FAPEB. Por otro lado, el filtro biológico junto con filtros químicos de amplio espectro consigue alcanzar un FPS de 25 y UVA_{FPS} de 15.3, más altos que con solo el filtro biológico, pero lo más relevante, es que esta combinación consigue duplicar la actividad antioxidante que se alcanza solo con filtros químicos.

Material suplementario

Capítulo 1

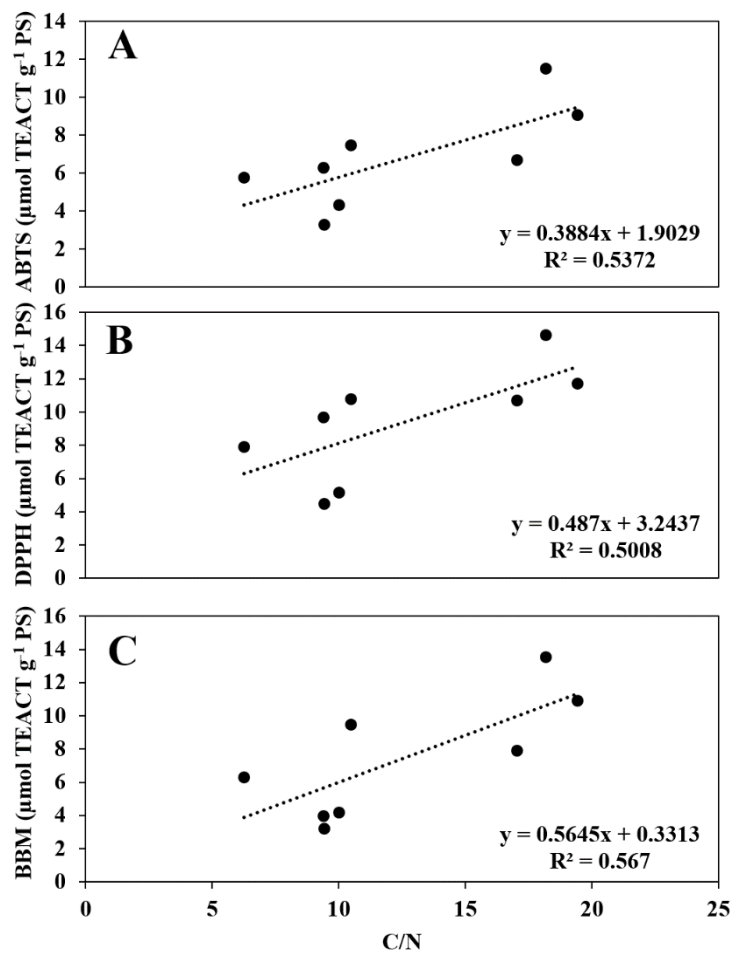


Figura S.1.1. Correlación entre la relación C/N y la capacidad antioxidante evaluada mediante los métodos ABTS (A), DPPH (B) y BBM C para las 8 especies estudiadas.

Tabla S.1.1. Parámetros estadísticos para las correlaciones encontradas entre la relación C/N y los métodos antioxidantes empleados.

Parámetro estadístico	C/N - ABTS	C/N - DPPH	C/N - DPPH
m (pendiente)	0.39	0.49	0.56
B (intercepto)	1.90	3.24	0.33
r de Pearson	0.73	0.71	0.75
R²	0.54	0.50	0.57
n	8	8	8
p	0.04	0.05	0.03

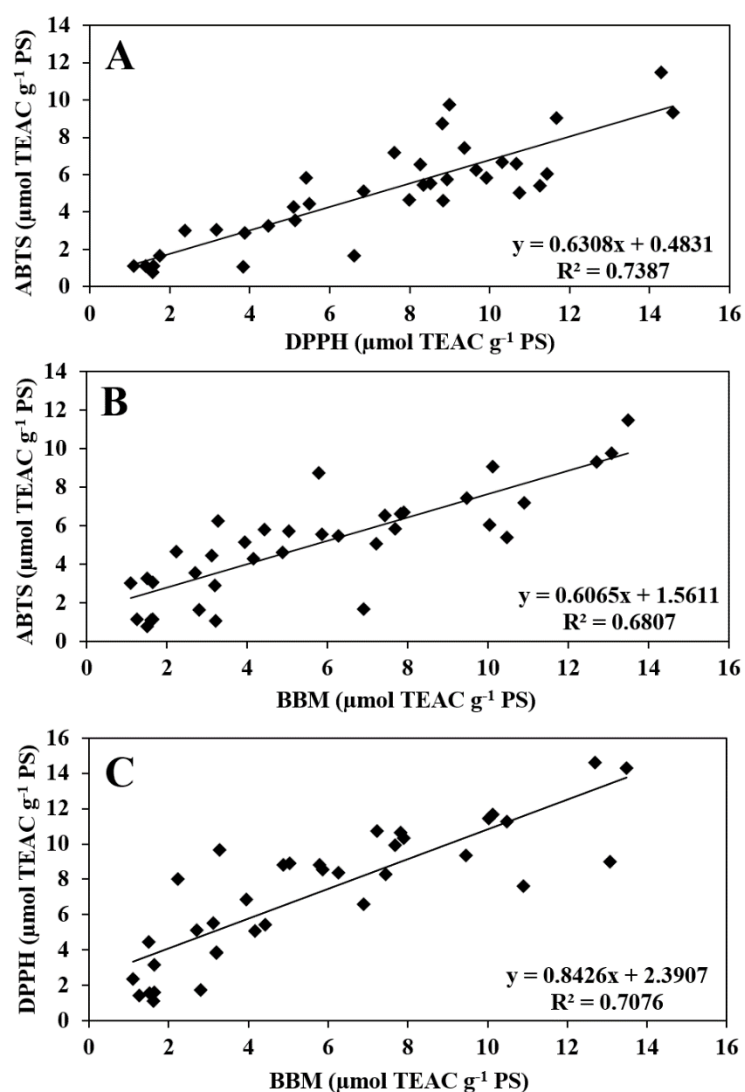


Figura S.1.2. Correlación entre los distintos métodos antioxidantes empleados. ABTS-DPPH (A), ABTS-BBM (B) y DPPH-BBM (C).

Tabla S.1.2. Parámetros estadísticos para las correlaciones encontradas entre los distintos métodos antioxidantes empleados.

Parámetro estadístico	ABTS-DPPH	ABTS-BBM	DPPH-BBM
m (pendiente)	0.63	0.61	0.84
B (intercepto)	0.48	1.56	2.39
r de Pearson	0.86	0.83	0.84
R²	0.74	0.68	0.71
n	36	36	36
p	0.00	0.00	0.00

Capítulo 2

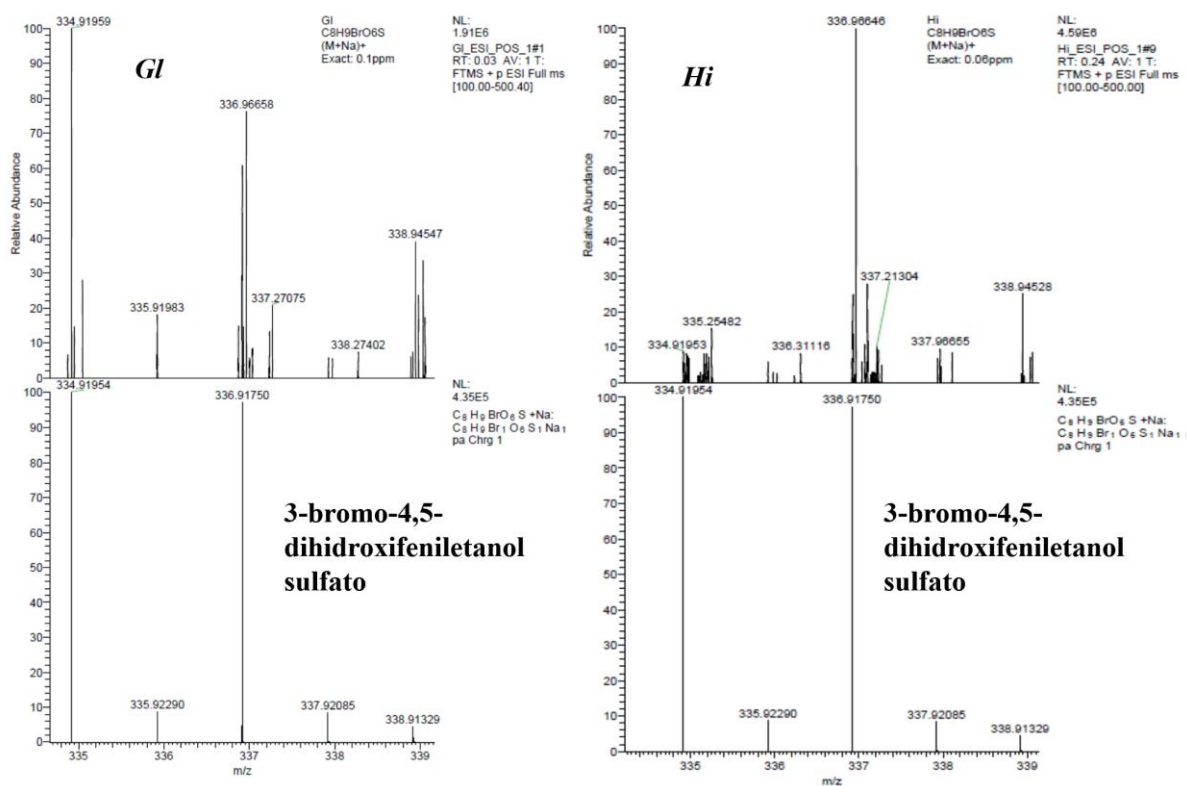


Figura S.2.1. Cromatogramas obtenidos mediante espectrometría de masas (ESI-MS) para el compuesto bromofenólico (3-bromo-4,5-dihidroxisfeniletanol sulfato; C₈H₉BrO₆S) encontrados en *Gracilariopsis longissima* (Gl) y *Halopithys incurva* (Hi).

Tabla S.2.1. ANOVA factorial para los factores tiempo (T: 4, 8, 14 días), luz (L: PAR y PAB), cilindro (C: anidado en L) y para la interacción (T x L) en las diferentes variables dependientes para *Hydropuntia cornea*. Los valores de significancia se establecieron en $p < 0.05$. $n = 6$ y aparecen marcados en negrita.

Variable	Fuente de variación	g.l.	F	<i>p</i>	PV (%)
F_v/F_m	T	2	0.5	0.66	7.8
	L	1	4.4	0.17	67.8
	C (L)	4	0.4	0.84	5.4
	T x L	2	1.2	0.31	19.0
	Residual	26			
ETR_{max} ($\mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	T	2	0.8	0.57	6.8
	L	1	0.5	0.55	4.7
	C (L)	4	0.4	0.84	3.2
	T x L	2	9.5	0.00	85.3
	Residual	26			
NPQ_{max} ($\mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	T	2	0.0	0.97	0.6
	L	1	2.3	0.27	41.0
	C (L)	4	2.0	0.12	35.4
	T x L	2	1.3	0.29	23.0
	Residual	26			
α_{ETR}	T	2	0.1	0.89	1.4
	L	1	0.4	0.59	4.2
	C (L)	4	1.8	0.17	18.6
	T x L	2	7.2	0.00	75.8
	Residual	26			
Ek_{ETR} ($\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	T	2	0.7	0.58	17.7
	L	1	0.8	0.48	18.6
	C (L)	4	0.5	0.72	13.0
	T x L	2	2.1	0.15	50.7
	Residual	26			
I_m ($\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	T	2	1.4	0.42	19.7
	L	1	0.4	0.57	6.4
	C (L)	4	0.3	0.90	3.8
	T x L	2	4.8	0.02	70.1
	Residual	26			
α_{NPQ}	T	2	0.3	0.79	6.3
	L	1	2.0	0.30	45.0
	C (L)	4	0.2	0.95	4.2
	T x L	2	1.9	0.17	44.5
	Residual	26			
C (%)	T	2	16.1	0.06	90.8
	L	1	0.1	0.78	0.6
	C (L)	4	0.7	0.61	3.9
	T x L	2	0.8	0.44	4.8
	Residual	26			
N (%)	T	2	9.8	0.09	72.9
	L	1	0.7	0.48	5.6
	C (L)	4	0.5	0.72	3.9
	T x L	2	2.4	0.11	17.6
	Residual	26			
Chla (mg g ⁻¹ PS)	T	2	0.6	0.62	1.1
	L	1	0.0	0.86	0.1

	C (L)	4	1.1	0.40	1.9
	T x L	2	54.4	0.00	97.0
	Residual	26			
Carotenoides (mg g ⁻¹ PS)	T	2	0.1	0.95	0.3
	L	1	15.3	0.06	88.8
	C (L)	4	0.7	0.59	4.2
	T x L	2	1.2	0.33	6.7
	Residual	26			
FC (mg g ⁻¹ PS)	T	2	11.3	0.08	47.4
	L	1	10.6	0.08	44.4
	C (L)	4	0.6	0.68	2.4
	T x L	2	1.4	0.27	5.8
	Residual	26			
FE (mg g ⁻¹ PS)	T	2	5.9	0.15	36.0
	L	1	8.5	0.10	52.0
	C (L)	4	0.3	0.86	2.0
	T x L	2	1.6	0.21	10.1
	Residual	26			
Carbohidratos (%)	T	2	0.1	0.89	1.0
	L	1	0.5	0.57	3.6
	C (L)	4	0.2	0.92	1.8
	T x L	2	11.9	0.00	93.6
	Residual	26			
Lípidos (%)	T	2	0.3	0.75	2.1
	L	1	0.3	0.67	1.6
	C (L)	4	3.2	0.03	20.7
	T x L	2	11.6	0.00	75.5
	Residual	26			
Proteínas (%)	T	2	0.0	0.97	1.3
	L	1	0.5	0.57	17.0
	C (L)	4	0.9	0.47	33.9
	T x L	2	1.3	0.29	47.8
	Residual	26			
MAAs totales (mg g ⁻¹ PS)	T	2	2.1	0.33	5.5
	L	1	31.9	0.03	84.3
	C (L)	4	0.5	0.74	1.3
	T x L	2	3.4	0.05	9.0
	Residual	26			
Palythine (%)	T	2	88.9	0.01	80.1
	L	1	19.8	0.05	17.9
	C (L)	4	2.2	0.13	1.9
	T x L	2	0.1	0.87	0.1
	Residual	26			
Asterina-330 (%)	T	2	0.7	0.60	3.9
	L	1	0.2	0.68	1.3
	C (L)	4	4.2	0.02	25.0
	T x L	2	11.8	0.00	69.8
	Residual	26			
Palythinol (%)	T	2	16.5	0.06	66.0
	L	1	2.2	0.28	8.6
	C (L)	4	0.4	0.64	1.8
	T x L	2	5.9	0.01	23.5
	Residual	26			
Shinorine (%)	T	2	0.3	0.79	1.9

	L	1	1.5	0.35	10.6
	C (L)	4	2.9	0.07	21.1
	T x L	2	9.1	0.00	66.4
	Residual	26			
Porphyra-334 (%)	T	2	4.6	0.18	59.3
	L	1	0.2	0.69	2.8
	C (L)	4	0.8	0.48	9.7
	T x L	2	2.2	0.13	28.3
	Residual	26			
Compuestos fenólicos (mg g ⁻¹ PS)	T	2	1.6	0.38	15.1
	L	1	1.5	0.34	14.3
	C (L)	4	0.4	0.82	3.5
	T x L	2	7.3	0.00	67.2
	Residual	26			
ABTS (μmol TE g ⁻¹ PS)	T	2	0.9	0.52	1.0
	L	1	3.2	0.22	3.6
	C (L)	4	0.7	0.60	0.8
	T x L	2	83.6	0.00	94.6
	Residual	26			
Productividad de biomasa (g PS m ⁻² d ⁻¹)	T	2	15.2	0.06	88.4
	L	1	0.0	0.90	0.1
	C (L)	2	0.5	0.66	2.7
	T x L	2	1.5	0.33	8.8
	Residual	4			
Crecimiento (% día ⁻¹)	T	2	20.9	0.05	75.4
	L	1	5.7	0.14	20.5
	C (L)	2	0.3	0.73	1.2
	T x L	2	0.8	0.51	2.9
	Residual	4			

Tabla S.2.2. ANOVA factorial para los factores tiempo (T: 4, 8, 14 días), luz (L: PAR y PAB), cilindro (C: anidado en L) y para la interacción (T x L) en las diferentes variables dependientes para *Gracilariopsis longissima*. Los valores de significancia se establecieron en $p < 0.05$. $n = 6$ y aparecen marcados en negrita.

Variable	Fuente de variación	g.l.	F	<i>p</i>	PV (%)
F_v/F_m	T	2	1.8	0.35	47.4
	L	1	0.3	0.65	7.4
	C (L)	4	0.7	0.59	18.3
	T x L	2	1.0	0.37	26.9
	Residual	26			
ETR_{max} ($\mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	T	2	43.6	0.02	61.0
	L	1	26.4	0.04	37.0
	C (L)	4	0.8	0.56	1.1
	T x L	2	0.7	0.53	0.9
	Residual	26			
NPQ_{max} ($\mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	T	2	1.3	0.43	14.5
	L	1	5.7	0.14	64.3
	C (L)	4	0.2	0.93	2.4
	T x L	2	1.7	0.21	18.7
	Residual	26			
α_{ETR}	T	2	6.8	0.13	58.1
	L	1	1.4	0.36	11.8
	C (L)	4	1.6	0.20	13.6
	T x L	2	1.9	0.17	16.5
	Residual	26			
E_{kETR} ($\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	T	2	8.8	0.10	47.5
	L	1	5.3	0.15	28.9
	C (L)	4	2.1	0.11	11.2
	T x L	2	2.3	0.12	12.3
	Residual	26			
I_{opt} ($\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	T	2	3.4	0.23	61.5
	L	1	0.4	0.59	7.1
	C (L)	4	0.5	0.75	8.6
	T x L	2	1.3	0.30	22.8
	Residual	26			
α_{NPQ}	T	2	3.1	0.24	42.5
	L	1	2.0	0.30	26.9
	C (L)	4	1.2	0.33	16.7
	T x L	2	1.0	0.38	13.8
	Residual	26			
C (%)	T	2	10.3	0.09	40.1
	L	1	14.4	0.06	55.8
	C (L)	4	0.4	0.78	1.7
	T x L	2	0.6	0.54	2.4
	Residual	26			
N (%)	T	2	6.0	0.14	82.3
	L	1	0.0	0.89	0.3
	C (L)	4	0.9	0.48	12.3
	T x L	2	0.4	0.69	5.1
	Residual	26			
Chla (mg g^{-1} PS)	T	2	0.7	0.58	10.2
	L	1	0.0	0.85	0.6

	C (L)	4	0.2	0.96	2.2
	T x L	2	6.3	0.01	87.0
	Residual	26			
Carotenoides (mg g ⁻¹ PS)	T	2	11.2	0.08	21.2
	L	1	40.9	0.02	77.0
	C (L)	4	0.4	0.79	0.8
	T x L	2	0.5	0.59	1.0
	Residual	26			
FC (mg g ⁻¹ PS)	T	2	0.4	0.72	0.7
	L	1	0.3	0.62	0.6
	C (L)	4	0.9	0.45	1.8
	T x L	2	50.6	0.00	96.8
	Residual	26			
FE (mg g ⁻¹ PS)	T	2	2.2	0.31	18.1
	L	1	8.0	0.11	65.1
	C (L)	4	1.0	0.44	7.9
	T x L	2	1.1	0.35	8.8
	Residual	26			
Carbohidratos (%)	T	2	32.7	0.03	79.2
	L	1	6.9	0.12	16.8
	C (L)	4	0.4	0.83	0.9
	T x L	2	1.3	0.29	3.1
	Residual	26			
Lípidos (%)	T	2	1.4	0.41	20.1
	L	1	2.9	0.23	39.9
	C (L)	4	0.6	0.66	8.5
	T x L	2	2.3	0.12	31.5
	Residual	26			
Proteínas (%)	T	2	0.5	0.67	3.1
	L	1	0.4	0.58	2.7
	C (L)	4	0.6	0.66	3.9
	T x L	2	14.2	0.00	90.2
	Residual	26			
MAAs totales (mg g ⁻¹ PS)	T	2	1.6	0.39	2.2
	L	1	6.7	0.12	9.3
	C (L)	4	0.3	0.89	0.4
	T x L	2	63.7	0.00	88.2
	Residual	26			
Palythine (%)	T	2	0.0	0.99	0.0
	L	1	0.0	0.90	0.1
	C (L)	4	1.8	0.18	5.7
	T x L	2	30.3	0.00	94.2
	Residual	26			
Asterina-330 (%)	T	2	1.2	0.45	3.5
	L	1	4.6	0.17	13.1
	C (L)	4	0.4	0.70	1.0
	T x L	2	28.6	0.00	82.3
	Residual	26			
Palythinol (%)	T	2	3.0	0.25	2.2
	L	1	0.9	0.45	0.6
	C (L)	4	3.5	0.04	2.6
	T x L	2	127.3	0.00	94.5
	Residual	26			
Shinorine (%)	T	2	4.6	0.18	12.3

	L	1	1.8	0.31	4.9
	C (L)	4	0.4	0.69	1.0
	T x L	2	30.5	0.00	81.8
	Residual	26			
Porphyra-334 (%)	T	2	21.1	0.05	74.2
	L	1	1.5	0.35	5.2
	C (L)	4	0.4	0.66	1.5
	T x L	2	5.4	0.01	19.1
	Residual	26			
Compuestos fenólicos (mg g⁻¹ PS)	T	2	2.6	0.28	35.4
	L	1	1.2	0.39	16.6
	C (L)	4	0.6	0.70	7.6
	T x L	2	3.0	0.07	40.5
	Residual	26			
ABTS (μmol TE g⁻¹ PS)	T	2	1.9	0.34	17.9
	L	1	4.9	0.16	46.4
	C (L)	4	0.1	0.99	0.7
	T x L	2	3.7	0.04	35.0
	Residual	26			
Productividad de biomasa (g PS m⁻² d⁻¹)	T	2	12.6	0.07	62.8
	L	1	3.6	0.20	17.9
	C (L)	2	0.1	0.95	0.3
	T x L	2	3.8	0.12	19.1
	Residual	4			
Crecimiento (% día⁻¹)	T	2	19.4	0.05	76.3
	L	1	1.9	0.30	7.6
	C (L)	2	0.1	0.90	0.4
	T x L	2	4.0	0.11	15.7
	Residual	4			

Tabla S.2.3. ANOVA factorial para los factores tiempo (T: 4, 8, 14 días), luz (L: PAR y PAB), cilindro (C: anidado en L) y para la interacción (T x L) en las diferentes variables dependientes para *Halopithys incurva*. Los valores de significancia se establecieron en $p < 0.05$. $n = 6$ y aparecen marcados en negrita.

Variable	Fuente de variación	g.l.	F	<i>p</i>	PV (%)
F_v/F_m	T	2	7.1	0.12	28.2
	L	1	8.8	0.10	35.0
	C (L)	4	6.7	0.00	26.7
	T x L	2	2.6	0.10	10.2
	Residual	26			
ETR_{max} ($\mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	T	2	2.6	0.28	7.5
	L	1	0.3	0.64	0.9
	C (L)	4	1.0	0.41	3.0
	T x L	2	30.5	0.00	88.7
	Residual	26			
NPQ_{max} ($\mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	T	2	0.9	0.53	7.5
	L	1	3.2	0.21	27.0
	C (L)	4	4.3	0.01	35.5
	T x L	2	3.6	0.04	29.9
	Residual	26			
α_{ETR}	T	2	0.3	0.75	3.2
	L	1	1.5	0.34	14.3
	C (L)	4	1.8	0.16	17.2
	T x L	2	6.8	0.00	65.2
	Residual	26			
E_{kETR} ($\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	T	2	6.5	0.13	36.9
	L	1	6.1	0.13	34.7
	C (L)	4	0.4	0.77	2.5
	T x L	2	4.6	0.02	25.9
	Residual	26			
I_m ($\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	T	2	0.8	0.54	7.9
	L	1	2.8	0.23	26.4
	C (L)	4	3.7	0.02	34.2
	T x L	2	3.4	0.05	31.5
	Residual	26			
α_{NPQ}	T	2	0.3	0.74	2.6
	L	1	5.9	0.14	43.3
	C (L)	4	6.1	0.00	44.6
	T x L	2	1.3	0.29	9.5
	Residual	26			
C (%)	T	2	2.1	0.32	23.0
	L	1	0.1	0.76	1.3
	C (L)	4	0.3	0.87	3.3
	T x L	2	6.7	0.00	72.4
	Residual	26			
N (%)	T	2	5.7	0.15	53.9
	L	1	0.3	0.65	2.7
	C (L)	4	0.4	0.78	4.2
	T x L	2	4.2	0.03	39.3
	Residual	26			
Chla (mg g^{-1} PS)	T	2	21.4	0.04	85.6
	L	1	1.4	0.36	5.6

	C (L)	4	0.1	0.99	0.2
	T x L	2	2.1	0.14	8.6
	Residual	26			
Carotenoides (mg g ⁻¹ PS)	T	2	2.2	0.31	12.7
	L	1	0.3	0.65	1.7
	C (L)	4	0.2	0.91	1.4
	T x L	2	14.5	0.00	84.2
	Residual	26			
FC (mg g ⁻¹ PS)	T	2	437.4	0.00	98.5
	L	1	5.4	0.15	1.2
	C (L)	4	1.3	0.29	0.3
	T x L	2	0.0	0.98	0.0
	Residual	26			
FE (mg g ⁻¹ PS)	T	2	25.3	0.04	92.7
	L	1	0.4	0.59	1.5
	C (L)	4	1.2	0.32	4.5
	T x L	2	0.3	0.71	1.3
	Residual	26			
Carbohidratos (%)	T	2	0.5	0.69	1.8
	L	1	0.3	0.67	1.0
	C (L)	4	0.3	0.87	1.3
	T x L	2	24.0	0.00	95.9
	Residual	26			
Lípidos (%)	T	2	6.5	0.13	46.7
	L	1	5.2	0.15	37.5
	C (L)	4	0.4	0.80	3.0
	T x L	2	1.8	0.19	12.9
	Residual	26			
Proteínas (%)	T	2	1.7	0.37	14.7
	L	1	8.5	0.10	72.2
	C (L)	4	0.3	0.90	2.3
	T x L	2	1.3	0.30	10.8
	Residual	26			
MAAs totales (mg g ⁻¹ PS)	T	2	21.2	0.05	69.9
	L	1	2.7	0.24	8.9
	C (L)	4	2.3	0.09	7.6
	T x L	2	4.1	0.03	13.6
	Residual	26			
Palythine (%)	T	2	0.4	0.70	4.5
	L	1	0.4	0.61	3.8
	C (L)	4	4.0	0.03	41.9
	T x L	2	4.7	0.02	49.7
	Residual	26			
Asterina-330 (%)	T	2	159.4	0.01	99.4
	L	1	0.0	0.90	0.0
	C (L)	4	0.4	0.69	0.2
	T x L	2	0.6	0.57	0.4
	Residual	26			
Palythinol (%)	T	2	0.4	0.71	3.7
	L	1	1.3	0.38	11.5
	C (L)	4	0.3	0.78	2.3
	T x L	2	9.0	0.00	82.4
	Residual	26			
Shinorine (%)	T	2	10.0	0.09	56.8

	L	1	0.1	0.75	0.7
	C (L)	4	4.8	0.02	27.5
	T x L	2	2.6	0.09	15.0
	Residual	26			
Porphyra-334 (%)	T	2	-	-	-
	L	1	-	-	-
	C (L)	4	-	-	-
	T x L	2	-	-	-
	Residual	26	-	-	-
Compuestos Fenólicos (mg g⁻¹ PS)	T	2	0.1	0.88	0.7
	L	1	2.1	0.28	10.4
	C (L)	4	0.6	0.69	2.8
	T x L	2	17.5	0.00	86.1
	Residual	26			
ABTS (μmol TE g⁻¹ PS)	T	2	0.2	0.84	1.0
	L	1	9.9	0.09	52.0
	C (L)	4	0.0	1.00	0.2
	T x L	2	8.9	0.00	46.7
	Residual	26			
Productividad de biomasa (g PS m⁻² d⁻¹)	T	2	1.0	0.51	0.5
	L	1	1.0	0.43	0.5
	C (L)	2	5.3	0.08	2.7
	T x L	2	192.1	0.00	96.4
	Residual	4			
Crecimiento (% día⁻¹)	T	2	2.1	0.33	11.8
	L	1	3.2	0.21	18.6
	C (L)	2	0.8	0.50	4.8
	T x L	2	11.3	0.02	64.8
	Residual	4			

Capítulo 3

Tabla S.3.1. ANOVA factorial para los efectos de las variables independientes estudiadas. Los factores se definieron como: luz (L: PAR y PAB), nutrientes (N: LN y HN), cilindro anidado (C) en L x N, y su interacción (L x N) para diferentes variables dependientes evaluadas en *Gracilariopsis longissima* tras 14 días de cultivo. Los valores significativos ($p < 0.05$) aparecen marcados en negrita. $n = 6$.

Variable	Fuente de variación	g.l.	F	p	PV (%)
F_v/F_m	L	1	5.4	0.05	54.9
	N	1	1.1	0.35	11.2
	C (L x N)	4	3.2	0.07	32
	L x N	1	0.2	0.68	1.9
	Residual	16			
ETR_{max} ($\mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	L	1	12.6	0.02	11.2
	N	1	67.6	0.00	60.3
	C (L x N)	4	0.1	0.97	0.1
	L x N	1	31.8	0.01	28.4
	Residual	16			
EK_{ETR} ($\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	L	1	9.2	0.04	40.4
	N	1	9.4	0.04	41.4
	C (L x N)	4	0.5	0.73	2.3
	L x N	1	3.6	0.13	15.9
	Residual	16			
I_m ($\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	L	1	8.1	0.05	28.7
	N	1	13.6	0.02	47.9
	C (L x N)	4	0.7	0.58	2.6
	L x N	1	5.9	0.05	20.8
	Residual	16			
NPQ_{max} ($\mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	L	1	0.1	0.76	0.9
	N	1	1.6	0.27	13.3
	C (L x N)	4	5.4	0.01	44.7
	L x N	1	5	0.09	41.2
	Residual	16			
Absorptancia	L	1	2.9	0.17	26
	N	1	5.9	0.04	53.9
	C (L x N)	4	1.4	0.28	12.8
	L x N	1	0.8	0.42	7.2
	Residual	16			
C (mg g^{-1} PS)	L	1	25.7	0.01	50.3
	N	1	15.2	0.02	29.8
	C (L x N)	4	1	0.42	2
	L x N	1	9.1	0.04	17.8
	Residual	16			
N (mg g^{-1} PS)	L	1	134.3	0.00	33.7
	N	1	260.1	0.00	65.2
	C (L x N)	4	0.2	0.93	0.1
	L x N	1	4	0.12	1
	Residual	16			
C/N	L	1	243	0.00	23.4

	N	1	743.4	0.00	71.7
	C (L x N)	4	0.1	0.99	0
	L x N	1	50.2	0.00	4.8
	Residual	16			
Chla (mg g ⁻¹ PS)	L	1	9.9	0.04	15.3
	N	1	54	0.00	83.7
	C (L x N)	4	0.5	0.74	0.8
	L x N	1	0.1	0.73	0.2
	Residual	16			
Carotenoides (mg g ⁻¹ PS)	L	1	30.8	0.01	71.2
	N	1	10.4	0.03	24
	C (L x N)	4	0.7	0.63	1.5
	L x N	1	1.4	0.30	3.3
	Residual	16			
FC (mg g ⁻¹ PS)	L	1	7.4	0.05	33
	N	1	12.2	0.03	54
	C (L x N)	4	2.5	0.08	11.1
	L x N	1	0.4	0.56	1.8
	Residual	16			
FE (mg g ⁻¹ PS)	L	1	4.6	0.10	11.2
	N	1	32.4	0.01	77.9
	C (L x N)	4	4.4	0.06	10.7
	L x N	1	0.1	0.79	0.2
	Residual	16			
Compuestos fenólicos (mg g ⁻¹ PS)	L	1	35.7	0.00	60.8
	N	1	7.9	0.05	13.4
	C (L x N)	4	1	0.45	1.7
	L x N	1	14.2	0.02	24.2
	Residual	16			
MAAs (mg g ⁻¹ PS)	L	1	54.8	0.00	37.4
	N	1	48.3	0.00	32.9
	C (L x N)	4	1.8	0.18	1.2
	L x N	1	41.8	0.00	28.5
	Residual	16			
Carbohidratos (mg g ⁻¹ PS)	L	1	12.5	0.02	47.7
	N	1	12	0.03	45.8
	C (L x N)	4	1.2	0.37	4.4
	L x N	1	0.5	0.50	2.1
	Residual	16			
Lípidos (mg g ⁻¹ PS)	L	1	27.7	0.01	97.6
	N	1	0.2	0.65	0.8
	C (L x N)	4	0.3	0.89	1
	L x N	1	0.2	0.71	0.6
	Residual	16			
Proteínas (mg g ⁻¹ PS)	L	1	6.4	0.06	10.4
	N	1	43.3	0.00	70.4
	C (L x N)	4	1.5	0.24	2.5
	L x N	1	10.3	0.03	16.7
	Residual	16			
ABTS (μmol TEAC g ⁻¹ PS)	L	1	19	0.01	72
	N	1	2.1	0.22	8
	C (L x N)	4	0.8	0.53	3.1
	L x N	1	4.5	0.10	16.9
	Residual	16			

Material suplementario

	L	1	110.9	0.00	24.5
*Viabilidad celular (%)	N	1	340.5	0.00	75.3
	L x N	1	0.9	0.38	0.2
	Residual	8			

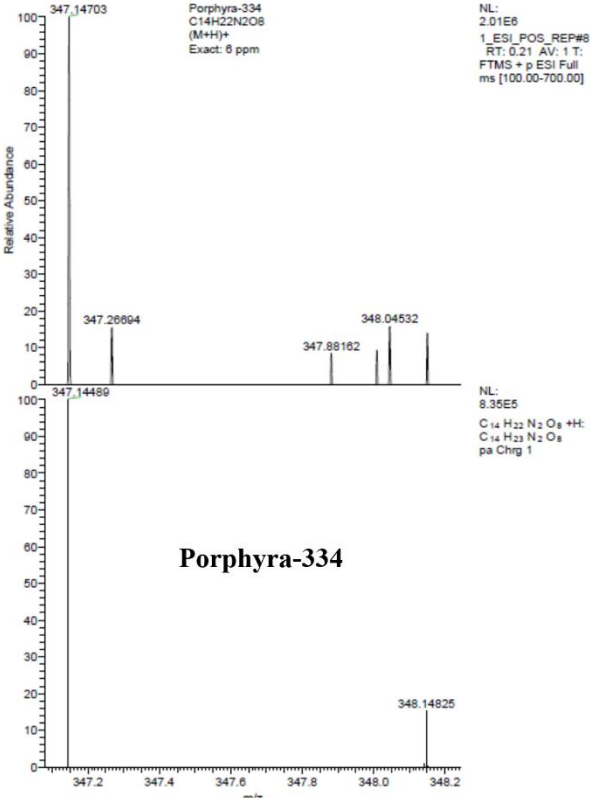
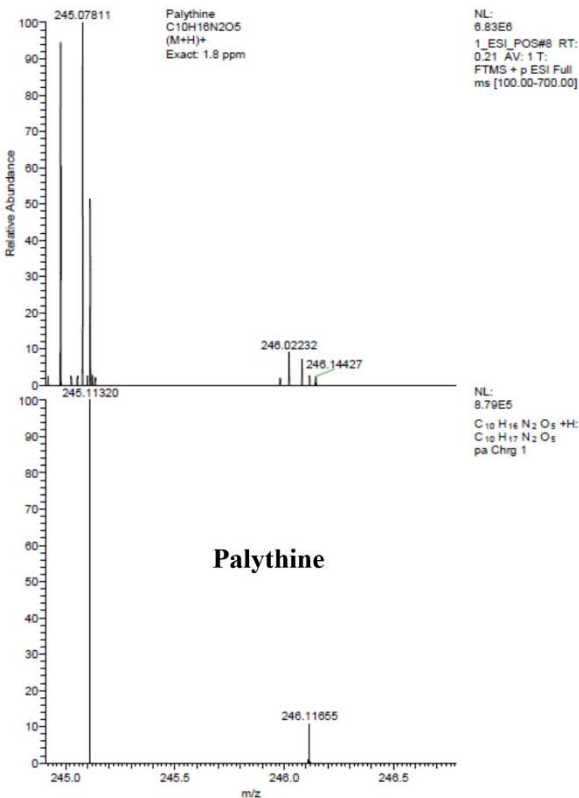
*Viabilidad celular (%). Fue evaluada mediante ANOVA de 2 vías (una réplica por cilindro).

Tabla S.3.2. Correlaciones de Pearson para las variables dependientes evaluadas en este estudio.

	ETR _{max}	EK _{ETR}	β	Fv/Fm	NPQ _{max}	Absorp ^a	C	N	C/N	FC + FE ^b	Chla	Car ^c	MAAs	Fenoles	ABTS	% CV ^d	Lípidos	Almidón	Proteínas
ETR _{max}	-	0.79 **	0.8 **	0.26	0.3	0.3	-0.05	0.46 *	-0.4 *	0.55 **	0.44 *	0.16	0.63 **	0.12	-0.11	0.6	-0.17	-0.35	0.33
EK _{ETR}		-	0.95 **	0.12	0.34	0.1	-0.04	0.46 *	-0.43 *	0.46 *	0.33	0.35	0.63 **	0.26	0.12	0.15	-0.19	-0.16	0.31
β			-	0.19	0.37	0.23	0.03	0.54 **	-0.48 *	0.47 *	0.46 *	0.37	0.7 **	0.24	0.05	0.26	-0.15	-0.24	0.33
Fv/Fm				-	-0.09	0.58 **	-0.41 *	-0.14	0.08	-0.11	-0.01	-0.37	-0.19	-0.72 **	-0.76 **	0.49 *	-0.69 **	-0.5 *	-0.16
NPQ _{max}					-	-0.07	0.13	0.47 *	-0.3	0.42 *	0.39	0.28	0.64 **	0.21	0.05	0.26	0.14	0.06	0.19
Absorp ^a						-	-0.39	0.14	-0.08	0.25	0.24	-0.1	0.14	-0.32	-0.51 *	0.57 **	-0.32	-0.45 *	0.18
C							-	-0.05	0.24	-0.14	-0.06	0.17	0.22	0.55 **	0.36	-0.67 **	0.48 *	0.56 **	-0.31
N								-	-0.93 **	0.79 **	0.78 **	0.76 **	0.83 **	0.51 *	0.19	0.38	0.4 *	-0.28	0.71 **
C/N									-	-0.72 **	-0.71 **	-0.73 **	-0.64 **	-0.36	-0.2	-0.42 *	-0.31	0.36	-0.78 **
PC + PE ^b										-	0.7 **	0.58 **	0.74 **	0.41 *	0.06	0.47 *	0.23	-0.26	0.76 **
Chla											-	0.64 **	0.59 **	0.34	0.15	0.47 *	0.07	-0.16	0.7 **
Car ^c												-	0.55 **	0.61 **	0.46 *	-0.02	0.47 *	-0.02	0.54 **
MAAs													-	0.54 **	0.75 **	0.21	0.37	-0.12	0.46 *
Fenoles														-	-	-0.42 *	0.6 **	0.47 *	0.38
ABTS															-	-0.46 *	0.52 **	0.54 **	0.36
% CV ^d																-	-0.28	-0.76 **	0.52 **
Lípidos																	-	0.15	0.27
Almidón																		-	-0.27
Proteínas																			-

^a Absorp: absorptancia ^b FC + FE: ficobiliproteínas; ^c Car: carotenoides y ^d % CV: porcentaje de Viabilidad celular.* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, $n = 12$

Capítulo 4



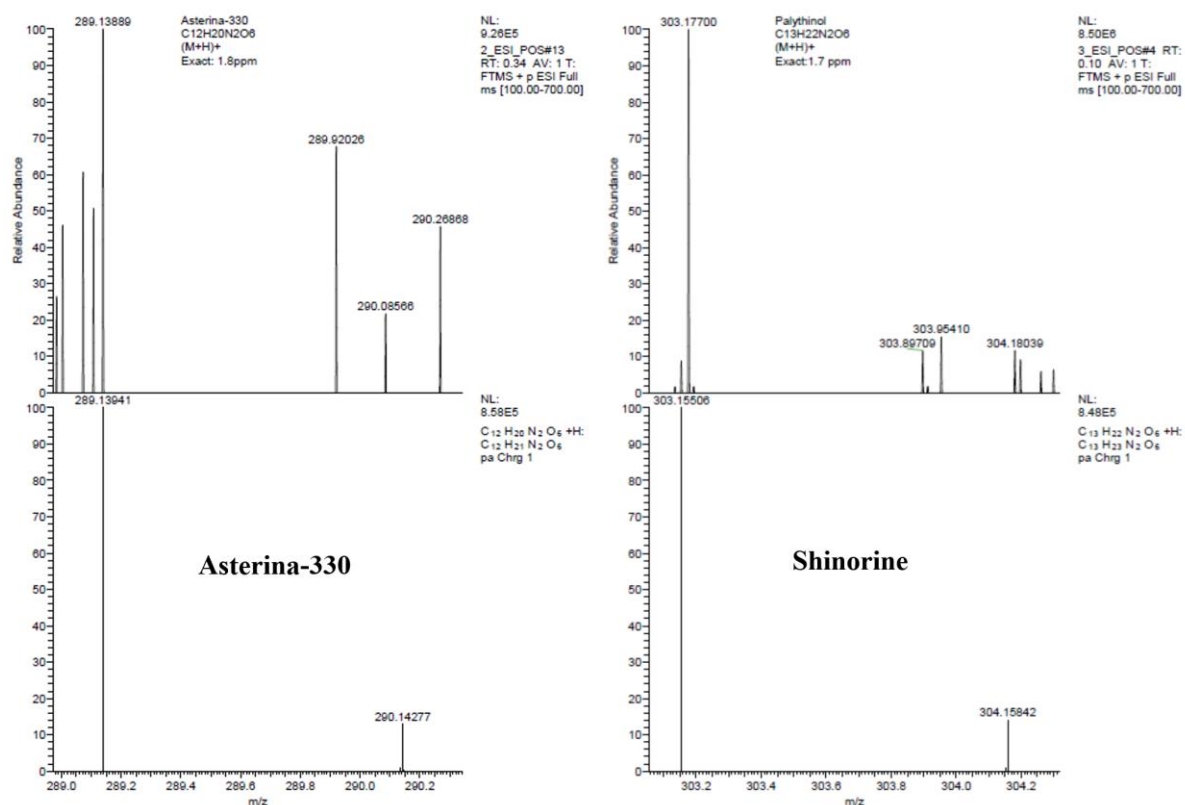


Figura S.4.1. Cromatogramas obtenidos mediante espectrometría de masas (ESI-MS) para los aminoácidos tipo micoporina (Palythine, Porphyra-334, Asterina-330 y Shinorine) encontrados en *Gracilariopsis longissima*, *Hydropuntia cornea* y *Halopithys incurva*.

Tabla S.4.1. ANOVA multifactorial para los efectos de las variables independientes: factor tiempo (T), factor luz [L: interior/invernadero (radiación solar filtrada y exterior (radiación solar))] y nutrientes [(N: baja disponibilidad (LN) y alta disponibilidad (HN)], cilindro anidado (C) en L x N, y sus interacción (T x L x N) para diferentes variables dependientes evaluadas en *Hydropuntia cornea* tras 14 días de cultivo. Los valores significativos ($p < 0.05$) aparecen marcados en negrita. n = 6.

Variable	Fuente de variación	g.l.	F	p	PV (%)
Absorptancia	T	4	2.9	0.34	9.4
	L	1	0.1	0.84	0.1
	N	1	22.2	0.01	72.6
	T*L	4	0.3	0.88	0.9
	T*N	4	2.2	0.23	7.1
	Anidado(L*N)	8	0.0	1.00	0.0
	T*L*N	4	3.0	0.02	9.8
	Error	152			
F _v /F _m	T	4	5.6	0.03	11.1
	L	1	6.3	0.07	12.7
	N	1	26.4	0.01	52.9
	T*L	4	7.2	0.04	14.4
	T*N	4	3.4	0.13	6.9
	Anidado(L*N)	8	0.7	0.68	1.4
	T*L*N	4	0.3	0.91	0.5
	Error	152			
ETR _{max} ($\mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	T	4	5.1	0.05	6.4
	L	1	0.5	0.54	0.6
	N	1	58.6	0.00	74.3
	T*L	4	8.7	0.03	11.0
	T*N	4	3.2	0.14	4.0
	Anidado(L*N)	8	2.7	0.01	3.4
	T*L*N	4	0.2	0.92	0.3
	Error	152			
NPQ _{max} ($\mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	T	4	3.3	0.38	1.5
	L	1	1.0	0.38	0.4
	N	1	204.5	0.00	96.3
	T*L	4	1.6	0.33	0.7
	T*N	4	0.4	0.81	0.2
	Anidado(L*N)	8	0.9	0.50	0.4
	T*L*N	4	0.7	0.61	0.3
	Error	152			
ETR/NPQ	T	4	5.0	0.11	5.1
	L	1	0.1	0.75	0.1
	N	1	87.2	0.00	88.7
	T*L	4	1.7	0.31	1.7
	T*N	4	1.4	0.38	1.4
	Anidado(L*N)	8	2.0	0.05	2.0
	T*L*N	4	1.0	0.43	1.0
	Error	152			
α_{ETR}	T	4	5.7	0.03	23.5
	L	1	0.0	0.98	0.0
	N	1	9.0	0.04	36.8
	T*L	4	4.3	0.09	17.7
	T*N	4	3.9	0.11	15.8
	Error	152			

	Anidado(L*N)	8	1.0	0.41	4.2
	T*L*N	4	0.5	0.73	2.1
	Error	152			
Ek _{ETR} ($\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	T	4	0.8	0.59	4.6
	L	1	0.9	0.39	5.5
	N	1	2.8	0.17	16.7
	T*L	4	3.1	0.15	18.9
	T*N	4	5.1	0.07	30.9
	Anidado(L*N)	8	3.4	0.00	20.5
	T*L*N	4	0.5	0.75	2.9
	Error	152			
α_{NPQ}	T	4			
	L	1	10.9	0.03	8.5
	N	1	113.1	0.00	88.3
	T*L	4	0.4	0.83	0.3
	T*N	4	0.3	0.88	0.2
	Anidado(L*N)	8	0.2	0.99	0.1
	T*L*N	4	3.3	0.01	2.6
	Error	152			
Ek _{NPQ} ($\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	T	4	5.6	0.81	21.8
	L	1	0.1	0.82	0.2
	N	1	15.0	0.02	58.0
	T*L	4	0.4	0.79	1.6
	T*N	4	0.8	0.59	3.1
	Anidado(L*N)	8	0.1	1.00	0.3
	T*L*N	4	3.9	0.01	15.0
	Error	152			
NUE (%)	T	4	3.3	0.13	4.9
	L	1	1.9	0.24	2.8
	N	1	44.3	0.00	65.4
	T*L	4	1.7	0.31	2.5
	T*N	4	14.7	0.01	21.7
	Anidado(L*N)	8	0.1	1.00	0.1
	T*L*N	4	1.8	0.14	2.6
	Error	152			
NUR ($\text{mmol m}^{-2} \text{ h}^{-1}$)	T	4	11.2	0.15	17.8
	L	1	10.5	0.03	16.7
	N	1	35.8	0.00	56.7
	T*L	4	0.3	0.84	0.5
	T*N	4	2.0	0.26	3.1
	Anidado(L*N)	8	0.9	0.53	1.4
	T*L*N	4	2.4	0.05	3.8
	Error	152			
Productividad de C ($\text{g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$)	T	1			
	L	1	6.3	0.24	3.5
	N	1	172.7	0.05	94.7
	T*L	1	0.0	0.91	0.0
	T*N	1	0.0	0.94	0.0
	Anidado(L*N)	8	1.4	0.31	0.8
	T*L*N	1	1.9	0.21	1.0
	Error	8			
Productividad de N ($\text{g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$)	T	1	7.3	0.48	1.3
	L	1	0.5	0.61	0.1
	N	1	566.7	0.03	97.8

	T*L	1	1.2	0.48	0.2
	T*N	1	0.9	0.52	0.2
	Anidado(L*N)	8	2.8	0.09	0.5
	T*L*N	1	0.2	0.67	0.0
	Error	8			
PF/PS	T	4	0.3	0.85	2.3
	L	1	2.7	0.18	18.8
	N	1	3.7	0.13	26.1
	T*L	4	1.3	0.40	9.2
	T*N	4	1.9	0.27	13.5
	Anidado(L*N)	8	0.3	0.97	2.0
	T*L*N	4	4.0	0.00	28.1
	Error	152			
Humedad (%)	T	4	0.6	0.71	4.3
	L	1	2.8	0.17	20.8
	N	1	3.6	0.13	26.4
	T*L	4	1.2	0.42	9.2
	T*N	4	1.2	0.44	8.6
	Anidado(L*N)	8	0.3	0.95	2.5
	T*L*N	4	3.8	0.01	28.2
	Error	152			
Cenizas (%)	T	4	0.8	0.58	3.4
	L	1	0.4	0.58	1.5
	N	1	10.2	0.03	43.4
	T*L	4	4.8	0.08	20.3
	T*N	4	1.6	0.33	6.8
	Anidado(L*N)	8	0.8	0.58	3.5
	T*L*N	4	5.0	0.00	21.1
	Error	152			
Materia orgánica (%)	T	4	0.2	0.91	1.5
	L	1	3.0	0.16	19.1
	N	1	0.3	0.60	2.0
	T*L	4	3.1	0.15	19.9
	T*N	4	4.2	0.10	27.2
	Anidado(L*N)	8	0.3	0.96	2.0
	T*L*N	4	4.4	0.00	28.2
	Error	152			
S/V	T	4	1.7	0.54	0.2
	L	1	11.1	0.04	1.2
	N	1	894.0	0.00	97.9
	T*L	4	2.2	0.26	0.2
	T*N	4	0.0	1.00	0.0
	Anidado(L*N)	8	0.2	0.98	0.0
	T*L*N	4	4.3	0.01	0.5
	Error	152			
Crecimiento (% día ⁻¹)	T	4	4.5	0.09	32.4
	L	1	0.4	0.59	2.5
	N	1	1.4	0.31	10.0
	T*L	4	1.3	0.40	9.4
	T*N	4	4.1	0.10	29.4
	Anidado(L*N)	8	1.1	0.41	7.7
	T*L*N	4	1.2	0.32	8.8
	Error	32			
Productividad de Biomasa	T	4	11.2	0.16	66.9

(g PS m ⁻² d ⁻¹)	L	1	1.9	0.24	11.2
	N	1	0.1	0.82	0.4
	T*L	4	1.0	0.52	5.7
	T*N	4	1.0	0.48	6.3
	Anidado(L*N)	8	0.5	0.86	2.8
	T*L*N	4	1.1	0.36	6.8
	Error	32			
C (%)	T	4	3.1	0.42	18.5
	L	1	7.7	0.22	45.4
	N	1	0.1	0.80	0.6
	T*L	4	0.1	0.84	0.4
	T*N	4	4.8	0.27	28.7
	Anidado(L*N)	8	0.3	0.96	1.6
	T*L*N	4	0.8	0.40	4.8
N (%)	T	4	37.4	0.78	54.5
	L	1	3.1	0.33	4.5
	N	1	10.7	0.19	15.6
	T*L	4	0.1	0.85	0.1
	T*N	4	1.4	0.45	2.0
	Anidado(L*N)	8	1.0	0.50	1.5
	T*L*N	4	15.0	0.00	21.9
C/N	T	4	3.4	0.32	13.7
	L	1	0.1	0.78	0.5
	N	1	4.0	0.30	16.0
	T*L	4	0.9	0.52	3.4
	T*N	4	14.4	0.16	58.0
	Anidado(L*N)	8	0.9	0.58	3.5
	T*L*N	4	1.2	0.30	4.9
Compuestos fenólicos (mg g ⁻¹ PS)	T	4	6.5	0.13	41.3
	L	1	3.8	0.12	23.8
	N	1	0.0	0.98	0.0
	T*L	4	1.0	0.52	6.1
	T*N	4	1.6	0.34	9.8
	Anidado(L*N)	4	1.4	0.24	8.8
	T*L*N	4	1.6	0.17	10.3
ABTS (μmol TEAC g ⁻¹ PS)	T	4	6.9	0.03	32.0
	L	1	1.3	0.32	5.9
	N	1	7.1	0.05	32.7
	T*L	4	2.2	0.24	10.0
	T*N	4	3.0	0.16	13.7
	Anidado(L*N)	4	0.5	0.72	2.4
	T*L*N	4	0.7	0.59	3.3
Chla (μg g ⁻¹ PS)	T	4	42.5	0.00	17.6
	L	1	19.6	0.00	8.1
	N	1	165.7	0.00	68.6
	T*L	4	4.7	0.00	1.9
	T*N	4	7.4	0.00	3.0
	Anidado(L*N)	4	0.4	0.79	0.2
	T*L*N	4	1.2	0.32	0.5

	Error	96			
Carotenoides ($\mu\text{g g}^{-1}$ PS)	T	4	4.2	0.05	9.4
	L	1	4.8	0.09	10.8
	N	1	21.8	0.01	48.7
	T*L	4	4.8	0.08	10.6
	T*N	4	7.7	0.04	17.1
	Anidado(L*N)	4	0.4	0.80	0.9
	T*L*N	4	1.1	0.37	2.4
	Error	96			
FC (mg g ⁻¹ PS)	T	4	5.5	0.00	58.7
	L	1	0.5	0.48	5.2
	N	1	0.0	0.86	0.3
	T*L	4	2.0	0.10	21.2
	T*N	4	0.2	0.92	2.5
	Anidado(L*N)	4	0.8	0.53	8.4
	T*L*N	4	0.3	0.85	3.6
	Error	96			
FE (mg g ⁻¹ PS)	T	4	11.5	0.00	32.3
	L	1	3.6	0.06	10.2
	N	1	12.8	0.00	36.0
	T*L	4	6.2	0.00	17.3
	T*N	4	0.4	0.84	1.0
	Anidado(L*N)	4	0.8	0.56	2.1
	T*L*N	4	0.4	0.82	1.1
	Error	96			
Proteínas (%)	T	4	14.4	0.16	34.2
	L	1	1.3	0.31	3.2
	N	1	21.5	0.01	51.4
	T*L	4	1.6	0.33	3.9
	T*N	4	0.4	0.78	1.1
	Anidado(L*N)	4	0.2	0.96	0.4
	T*L*N	4	2.5	0.05	5.9
	Error	96			
Carbohidratos (%)	T	4			
	L	1	8.9	0.04	66.2
	N	1	1.5	0.29	10.8
	T*L	4	0.3	0.86	2.3
	T*N	4	0.6	0.68	4.6
	Anidado(L*N)	4	0.4	0.81	2.9
	T*L*N	4	1.8	0.14	13.1
	Error	96			
Lípidos (%)	T	4	5.1	0.22	37.5
	L	1	2.5	0.19	18.2
	N	1	2.3	0.21	16.8
	T*L	4	1.4	0.37	10.6
	T*N	4	0.8	0.60	5.7
	Anidado(L*N)	4	0.4	0.81	3.0
	T*L*N	4	1.1	0.35	8.3
	Error	96			
MAAs (mg g ⁻¹ PS)	T	4	11.8	0.02	16.2
	L	1	43.0	0.00	58.7
	N	1	10.1	0.03	13.8
	T*L	4	1.1	0.46	1.5
	T*N	4	4.5	0.09	6.2
	Error	96			

	Anidado(L*N)	4	1.4	0.25	1.9
	T*L*N	4	1.3	0.28	1.8
	Error	96			
Productividad de MAAs (g PS m ⁻² d ⁻¹)	T	4	2.0	0.26	1.4
	L	1	91.2	0.00	64.5
	N	1	8.2	0.05	5.8
	T*L	4	1.2	0.44	0.8
	T*N	4	10.0	0.02	7.1
	Anidado(L*N)	8	2.2	0.06	1.5
	T*L*N	4	5.2	0.00	3.7
	Error	32			
Ácidos grasos saturados (%)	T	1	94.5	0.08	28.0
	L	1	0.8	0.53	0.2
	N	1	224.9	0.04	66.5
	T*L	1	16.6	0.15	4.9
	T*N	1	0.0	0.96	0.0
	Anidado(L*N)	8	0.9	0.57	0.3
	T*L*N	1	0.3	0.58	0.1
	Error	6			
Ácidos grasos monoiinsaturados (%)	T	1			
	L	1	0.4	0.66	7.8
	N	1	1.6	0.42	35.8
	T*L	1	0.1	0.79	2.5
	T*N	1	0.0	0.92	0.3
	Anidado(L*N)	8	0.5	0.85	10.2
	T*L*N	1	2.0	0.20	43.3
	Error	6			
Ácidos grasos poliinsaturados (%)	T	1	51.9	0.08	15.4
	L	1	0.8	0.53	0.2
	N	1	2.7	0.35	0.8
	T*L	1	268.1	0.04	79.7
	T*N	1	11.9	0.18	3.5
	Anidado(L*N)	8	0.9	0.57	0.3
	T*L*N	1	0.0	0.88	0.0
	Error	6			
Omega-3 (%)	T	1	0.3	0.66	0.1
	L	1	98.5	0.06	35.7
	N	1	0.2	0.72	0.1
	T*L	1	0.5	0.61	0.2
	T*N	1	172.5	0.05	62.6
	Anidado(L*N)	8	3.5	0.05	1.3
	T*L*N	1	0.1	0.75	0.0
	Error	6			
Omega-6 (%)	T	1	52.0	0.08	14.4
	L	1	0.9	0.52	0.2
	N	1	5.2	0.26	1.4
	T*L	1	297.1	0.04	82.1
	T*N	1	5.6	0.25	1.6
	Anidado(L*N)	8	0.9	0.53	0.3
	T*L*N	1	0.0	0.88	0.0
	Error	6			
Omega-9 (%)	T	1			
	L	1	0.1	0.84	2.3
	N	1	0.2	0.72	7.5

	T*L	1	0.2	0.71	8.2
	T*N	1	0.2	0.75	5.8
	Anidado(L*N)	8	0.4	0.87	15.2
	T*L*N	1	1.7	0.23	61.0
	Error	6			
Omega-6/Omega-3	T	1	6.5	0.16	30.5
	L	1	1.1	0.48	5.4
	N	1	0.6	0.58	2.9
	T*L	1	4.0	0.30	18.6
	T*N	1	7.0	0.23	33.0
	Anidado(L*N)	8	1.0	0.47	4.9
	T*L*N	1	1.0	0.35	4.7
	Error	6			
CAT (U mg ⁻¹ TSP)	T	1			0.0
	L	1	3.0	0.33	3.7
	N	1	75.2	0.07	93.5
	T*L	1	0.3	0.67	0.4
	T*N	1	0.0	0.97	0.0
	Anidado(L*N)	4	0.1	0.97	0.2
	T*L*N	1	1.8	0.19	2.2
	Error	36			
SOD (U mg ⁻¹ TSP)	T	1	45.5	0.89	81.7
	L	1	0.5	0.61	0.9
	N	1	5.5	0.26	9.8
	T*L	1	1.1	0.49	2.0
	T*N	1	0.2	0.76	0.3
	Anidado(L*N)	4	0.6	0.66	1.1
	T*L*N	1	2.4	0.13	4.3
	Error	36			
POX (U mg ⁻¹ TSP)	T	1	12.7	0.24	55.8
	L	1	5.1	0.27	22.4
	N	1	0.1	0.83	0.3
	T*L	1	1.5	0.44	6.4
	T*N	1	1.6	0.43	6.9
	Anidado(L*N)	4	0.9	0.49	3.8
	T*L*N	1	1.0	0.33	4.3
	Error	36			
APX (U mg ⁻¹ TSP)	T	1	0.5	0.65	5.2
	L	1	0.1	0.80	1.1
	N	1	0.3	0.66	3.4
	T*L	1	4.2	0.29	41.5
	T*N	1	0.3	0.70	2.6
	Anidado(L*N)	4	1.3	0.29	13.0
	T*L*N	1	3.4	0.05	33.3
	Error	36			
GR (U mg ⁻¹ TSP)	T	1			0.0
	L	1	7.6	0.22	25.9
	N	1	14.6	0.16	49.9
	T*L	1	0.2	0.73	0.7
	T*N	1	0.0	0.88	0.1
	Anidado(L*N)	4	1.5	0.24	5.0
	T*L*N	1	5.4	0.03	18.4
	Error	36			
GPX (U mg ⁻¹ TSP)	T	1			0.0

	L	1	1.6	0.35	9.5
	N	1	0.7	0.56	3.9
	T*L	1	0.0	0.90	0.1
	T*N	1	0.3	0.69	1.7
	Anidado(L*N)	4	0.6	0.65	3.7
	T*L*N	1	13.9	0.00	81.1
	Error	36			
Y(II) (a 317 μ mol)	T	1	1.5	0.54	14.9
	L	1	0.4	0.65	3.8
	N	1	2.9	0.34	29.4
	T*L	1	2.5	0.36	25.9
	T*N	1	0.5	0.60	5.3
	Anidado(L*N)	8	0.8	0.64	7.9
	T*L*N	1	1.3	0.30	12.8
	Error	8			
Y(NO) (a 317 μ mol)	T	1			
	L	1	11.0	0.19	62.2
	N	1	2.7	0.35	15.4
	T*L	1	0.4	0.65	2.2
	T*N	1	0.4	0.63	2.5
	Anidado(L*N)	8	1.1	0.45	6.3
	T*L*N	1	2.0	0.19	11.5
	Error	8			
Y(NPQ) (a 317 μ mol)	T	1			
	L	1	1.6	0.43	5.4
	N	1	20.8	0.14	71.3
	T*L	1	0.8	0.53	2.9
	T*N	1	0.1	0.84	0.2
	Anidado(L*N)	8	0.6	0.75	2.1
	T*L*N	1	5.3	0.05	18.1
	Error	8			
Y(II) (a 317 μ mol)	T	1	0.8	0.56	0.8
	L	1	0.0	0.94	0.0
	N	1	81.8	0.07	86.6
	T*L	1	10.2	0.19	10.8
	T*N	1	0.1	0.78	0.1
	Anidado(L*N)	8	0.9	0.56	1.0
	T*L*N	1	0.6	0.48	0.6
	Error	8			
Y(NO) (a 317 μ mol)	T	1			
	L	1	12.1	0.18	53.2
	N	1	7.3	0.23	31.6
	T*L	1	0.3	0.68	1.3
	T*N	1	0.1	0.78	0.6
	Anidado(L*N)	8	0.9	0.57	3.9
	T*L*N	1	2.2	0.18	9.5
	Error	8			
Y(NPQ) (a 317 μ mol)	T	1			
	L	1	6.7	0.23	34.9
	N	1	9.0	0.20	46.9
	T*L	1	0.6	0.59	3.0
	T*N	1	0.2	0.75	0.9
	Anidado(L*N)	8	0.8	0.62	4.2
	T*L*N	1	2.0	0.20	10.2

Error	8
-------	---

Tabla S.4.2. Composición porcentual de ácidos grasos en *Hydropuntia cornea* al inicio del experimento, a los 7 y a los 35 días para los diferentes tratamientos objeto de estudio. Cada valor se representa como media \pm S.E. ($n = 3$).

Clasificación	Nombre	Nº Lipídico	Inicial	Día 7				Día 35			
				LN-I	LN-O	HN-I	HN-O	LN-I	LN-O	HN-I	HN-O
Saturados	Caproico	C6:0	0.4 \pm 0	0.6 \pm 0.2	0.5 \pm 0	0.4 \pm 0	0.5 \pm 0	0.6 \pm 0.1	0.5 \pm 0.1	0.6 \pm 0	0.5 \pm 0.1
	Capríco	C10:0	0.2 \pm 0	0.3 \pm 0.1	n.f.	0.3 \pm 0.1	0.2 \pm 0	0.2 \pm 0	0.2 \pm 0	0.2 \pm 0	n.f.
	Mirístico	C14:0	8.3 \pm 0.7	7.2 \pm 0.2	6 \pm 0.2	6.1 \pm 0.1	6.1 \pm 0.1	6 \pm 0.2	5 \pm 0.5	6.1 \pm 0.7	5.5 \pm 0.7
	Pentadecílico	C15:0	2.8 \pm 0.9	2 \pm 0.2	1.1 \pm 0.1	1.2 \pm 0.1	1.3 \pm 0.3	1.5 \pm 0.2	0.9 \pm 0.1	1.5 \pm 0.4	0.6 \pm 0.1
	Palmitico	C16:0	62.1 \pm 2.1	58 \pm 1.5	62.7 \pm 1.3	64 \pm 0.9	60.9 \pm 0.3	45.7 \pm 0.6	41.2 \pm 1.4	44.5 \pm 2.4	42.8 \pm 2.4
	Margarico	C17:0	1.3 \pm 0.3	0.5 \pm 0	0.4 \pm 0	0.5 \pm 0.1	0.5 \pm 0.1	0.5 \pm 0.1	0.3 \pm 0	0.5 \pm 0.1	0.3 \pm 0
	Estearico	C18:0	22.5 \pm 2.1	25.4 \pm 1	25.7 \pm 1.2	22.6 \pm 0.6	24.3 \pm 0.5	9.7 \pm 0.9	9.3 \pm 0.8	9.7 \pm 0.6	7.2 \pm 0.9
	Araquidico	C20:0	0.6 \pm 0.1	0.5 \pm 0	0.5 \pm 0	0.4 \pm 0	0.4 \pm 0	0.3 \pm 0	0.3 \pm 0	0.3 \pm 0	0.2 \pm 0
	Behénico	C22:0	0.2 \pm 0.2	0.5 \pm 0.1	0.4 \pm 0	0.4 \pm 0	0.5 \pm 0	0.6 \pm 0.1	0.4 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1	0.5 \pm 0
	Lignocérico	C24:0	1.1 \pm 0.2	0.7 \pm 0	0.7 \pm 0	0.7 \pm 0	0.7 \pm 0	0.6 \pm 0	0.5 \pm 0	0.7 \pm 0.1	0.3 \pm 0
Monoinsaturados	Miristoleico (ω 5)	C14:1n5	0.4 \pm 0	0.4 \pm 0	n.f.	n.f.	n.f.	0.2 \pm 0	0.2 \pm 0	0.2 \pm 0	n.f.
	Palmitoleico (ω 7)	C16:1n7	0.4 \pm 0	0.4 \pm 0.1	0.6 \pm 0	0.4 \pm 0.1	0.5 \pm 0.1	0.5 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1	0.7 \pm 0	1 \pm 0.1
	Oleico (ω 9)	C18:1n9c	0.6 \pm 0	0.8 \pm 0.2	0.9 \pm 0.3	0.7 \pm 0.5	1.1 \pm 0	7.2 \pm 0.3	8 \pm 0.8	7.5 \pm 0.7	6.5 \pm 0.3
	Erúico (9)	C22:1n9	0.2 \pm 0	0.9 \pm 0.4	0.5 \pm 0.2	0.2 \pm 0	1.3 \pm 0.4	2 \pm 0.2	1.6 \pm 0.5	1.9 \pm 0.5	2.1 \pm 0.4
	Linoleídico (ω 6)	C18:2n6t	0.5 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1	1 \pm 0	0.7 \pm 0	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.
Polinsaturados	Linoleico (ω 6)	C18:2n6c	0.2 \pm 0	0.4 \pm 0.1	n.f.	n.f.	n.f.	1 \pm 0.1	1 \pm 0.1	1 \pm 0	0.9 \pm 0
	Gamma linoleico (ω 6)	C18:3n6	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	0.3 \pm 0	0.3 \pm 0	0.3 \pm 0	0.3 \pm 0
	Linolénico (ω 3)	C18:3n3	0.4 \pm 0	0.6 \pm 0.2	0.5 \pm 0	0.5 \pm 0.3	0.3 \pm 0	0.5 \pm 0.1	0.4 \pm 0.1	0.9 \pm 0.2	0.8 \pm 0.1
	Eicosenoico (ω 9)	C20:1n9	0.1 \pm 0	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	0.2 \pm 0	0.2 \pm 0	0.2 \pm 0	0.2 \pm 0
	Eicosadienoico (ω 6)	C20:2n6	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	0.1 \pm 0	0.2 \pm 0	0.2 \pm 0	0.2 \pm 0
	Dihomon-gamma-linolénico (ω 6)	C20:3n6	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	1.6 \pm 0.2	1.7 \pm 0.2	0.9 \pm 0.1	1.4 \pm 0.1
	Araquidónico (ω 6)	C20:4n6	n.f.	0.9 \pm 0.5	n.f.	0.3 \pm 0	1.7 \pm 0.1	20.9 \pm 1.8	26.2 \pm 3.1	21.6 \pm 2.8	29.6 \pm 2.2
	Saturados totales		97.3 \pm 0.1	95 \pm 1.3	97 \pm 0.5	96.6 \pm 1	94.5 \pm 0.5	65.5 \pm 1.9	59.2 \pm 2.3	64.6 \pm 3.8	57.4 \pm 2.6
	Monoinsaturados totales		1.6 \pm 0.1	2.4 \pm 0.5	1.8 \pm 0.5	1.3 \pm 0.5	2.9 \pm 0.5	9.9 \pm 0.1	10.5 \pm 1.3	10.2 \pm 1.2	9.5 \pm 0.7
	Polinsaturados totales		1.1 \pm 0.1	2.5 \pm 0.8	1.2 \pm 0.2	2.1 \pm 0.6	2.7 \pm 0	24.6 \pm 2	30.3 \pm 3.4	25.1 \pm 2.8	33.2 \pm 2.3
Omega 3			19.5 \pm 1.4	15.5 \pm 3.3	22.1 \pm 3.3	16.2 \pm 2.1	6.6 \pm 0.5	1.6 \pm 0.2	1 \pm 0.2	2.8 \pm 0.8	1.9 \pm 0.4
	Omega 6		33.7 \pm 4.3	44.4 \pm 4.5	31.2 \pm 6.7	58.2 \pm 8.2	47.5 \pm 4	70.3 \pm 2.1	73.7 \pm 4.8	69.4 \pm 1.4	77.2 \pm 1.5
	Omega 9		46.8 \pm 3.4	40.1 \pm 1.2	46.6 \pm 9.8	25.6 \pm 6.6	45.9 \pm 3.9	28.2 \pm 1.9	25.3 \pm 4.7	27.8 \pm 1.2	20.8 \pm 1.2
	Omega 6 / Omega 3		1.8 \pm 0.3	3.2 \pm 0.8	1.4 \pm 0.2	3.8 \pm 0.9	7.3 \pm 0.9	47 \pm 7.7	79.1 \pm 18.2	28.8 \pm 6.9	43.6 \pm 9.5

n.f. no detectado

Capítulo 6

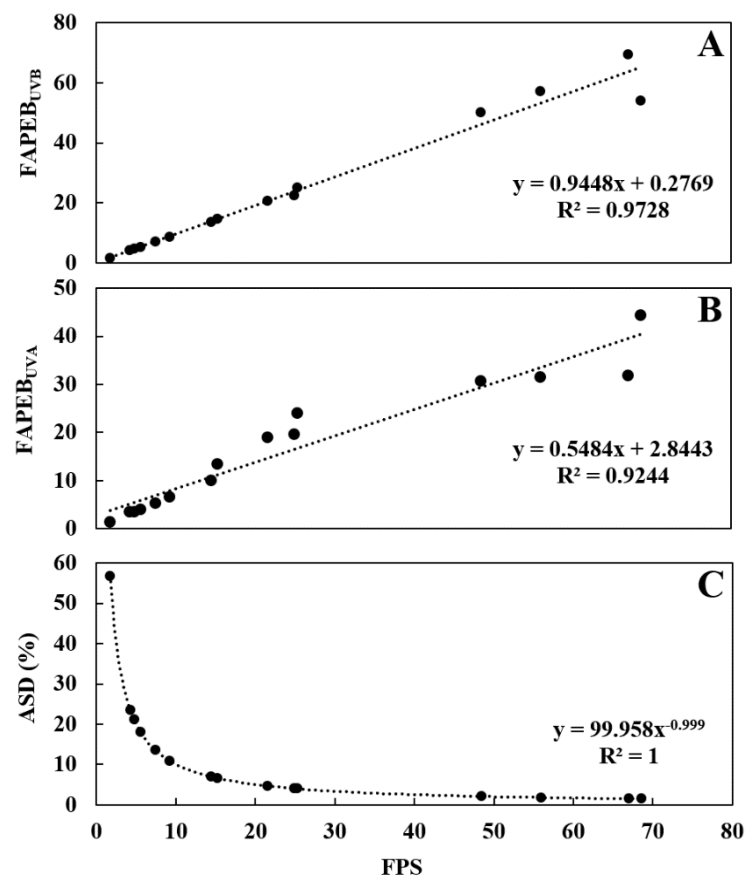


Figura S.6.1. Correlación entre el Factor de Protección Solar (FPS), el Factor de Protección frente a Efectos Biológicos (FAPEB), tanto de UVB (A) como de UVA (B) y la dosis acumulativa de quemaduras visibles (ASD %) (C).

Tabla S.6.1. Matriz de correlación entre los parámetros de fotoprotección estudiados para los productos cosméticos (n = 14)

	FPS	UVA _{FPS}	FPS/FAPEB _{UVB}	FPS/FAPEB _{UVA}	λc	ASD (%)	FAPEB _{UVB}	FAPEB _{UVA}	FAPEB _{UVB} /FPS	FAPEB _{UVA} /FPS
FPS		0.88**	-0.57**	-0.15	-0.61**	0.99**	0.96**	0.81**	-0.71**	-0.71**
UVA _{FPS}			-0.72**	-0.04	-0.59**	0.92**	0.87**	0.60**	-0.78**	-0.78**
FPS/FAPEB _{UVB}				-0.35	0.38	-0.60**	-0.64**	-0.27	0.97**	0.97**
λc						-0.16	-0.13	-0.12	-0.26	-0.28
ASD (%)							-0.61**	-0.68**	-0.30	0.43
FAPEB _{UVB}								0.93**	0.78**	-0.72**
FAPEB _{UVA}									0.77**	-0.76**
FAPEB _{UVB} /FPS										-0.42
FAPEB _{UVA} /FPS										

Referencias

- Aandira, J.R., Vergara, J.J. & Perez-Llorens, J.L. 1999. Biochemical responses and photosynthetic performance of *Gracilaria* sp.(Rhodophyta) from Cádiz, Spain, cultured under different inorganic carbon and nitrogen levels. *Eur. J. Phycol.* 34:497–504.
- Abd, E., Farouk, K. & Gamal, S. 2007. Production of carotenoids from marine microalgae and its evaluation as safe food colorant and lowering cholesterol agent. *Am. J. Agric. Environ. Sci.* 2:792–800.
- Abd, E., H.H., El-Baz, F.K. & El Baroty, G.S. 2010. Enhancing antioxidant availability in wheat grains from plants grown under seawater stress in response to microalgae extract treatments. *J. Sci. Food Agric.* 90:299–303.
- Abdala, R.T., Chabrilón, M., Cabello-Pasini, A., Gómez-Pinchetti, J.L. & Figueroa, F.L. 2011. Characterization of polysaccharides from *Hypnea spinella* (Gigartinales) and *Halopithys incurva* (Ceramiales) and their effect on RAW 264.7 macrophage activity. *J. Appl. Phycol.* 23:523–8.
- Abdala-Díaz, R.T., Cabello-Pasini, A., Pérez-Rodríguez, E., Conde-Álvarez, R.M. & Figueroa, F.L. 2006. Daily and seasonal variations of optimum quantum yield and phenolic compounds in *Cystoseira tamariscifolia* (Phaeophyta). *Mar. Biol.* 148:459–65.
- Abdala-Díaz, R.T., Chabrilón, M., Cabello-Pasini, A., López-Soler, B. & Figueroa, F.L. 2010. Effect of *Porphyridium cruentum* polysaccharides on the activity of murine macrophage cell line RAW 264.7. *Ciencias Mar.* 36:345–53.
- Abreu, M.H., Pereira, R., Buschmann, A.H., Sousa-Pinto, I. & Yarish, C. 2011a. Nitrogen uptake responses of *Gracilaria vermiculophylla* (Ohmi) Papenfuss under combined and single addition of nitrate and ammonium. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 407:190–9.
- Abreu, M.H., Pereira, R., Yarish, C., Buschmann, A.H. & Sousa-Pinto, I. 2011b. IMTA with *Gracilaria vermiculophylla*: productivity and nutrient removal performance of the seaweed in a land-based pilot scale system. *Aquaculture.* 312:77–87.
- Abu-Ghannam, N. & Rajauria, G. 2013. Antimicrobial activity of compounds isolated from algae. *Funct. Ingredients from Algae Foods Nutraceuticals; Domínguez, H., Ed.* 287–306.
- Acien, F.G., Gómez-Serrano, C., Morales-Amaral, M.M., Fernández-Sevilla, J.M. & Molina-Grima, E. 2016. Wastewater treatment using microalgae: how realistic a contribution might it be to significant urban wastewater treatment? *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100:9013–22.
- Aebi, H. 1984. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol.* 105:121–6.
- Agrawal, S.B. & Chaudhary, B.R. 1996. Chrysophyte cytology: compilation and evaluation. *Cytol. Genet. Mol. Biol. algae.* 173–91.
- Aguilera, J., Jiménez, C., Figueroa, F.L., Lebert, M. & Häder, D.P. 1999. Effect of ultraviolet radiation on thallus absorption and photosynthetic pigments in the red alga *Porphyra umbilicalis*. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 48:75–82.
- Aguilera, J., Karsten, U., Lippert, H., Vogele, B., Philippe, E., Hanelt, D. & Wiencke, C. 1991. Effects of solar radiation on growth, photosynthesis and respiration of marine macroalgae from the Arctic. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 191:301–9.
- Agustí, S., Enríquez, S., Frost-Christensen, H., Sand-Jensen, K. & Duarte, C.M. 1994. Light harvesting among photosynthetic organisms. *Funct. Ecol.* 273–9.

- Agyei, D. & Danquah, M.K. 2011. Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides. *Biotechnol. Adv.* 29:272–7.
- Ahmed, F.K. 2008. Worldwide Regulation of UV Filters. In *Clinical Guide to Sunscreens and Photoprotection*. CRC Press, pp. 65–81.
- Aitken, D., Bulboa, C., Godoy-Faundez, A., Turrion-Gomez, J.L. & Antizar-Ladislao, B. 2014. Life cycle assessment of macroalgae cultivation and processing for biofuel production. *J. Clean. Prod.* 75:45–56.
- Alam, M.N., Bristi, N.J. & Rafiquzzaman, M. 2012. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharm. J.* 21:143–52.
- Albert, C.M., Hennekens, C.H., O'Donnell, C.J., Ajani, U.A., Carey, V.J., Willett, W.C., Ruskin, J.N. et al. 1998. Fish consumption and risk of sudden cardiac death. *Jama.* 279:23–8.
- Alcalde, M.T. 2008. Cosmética natural y ecológica. *Offarm.* 27:96–103.
- Algarra, P. & Rudiger, W. 1993. Acclimation processes in the light harvesting complex of the red alga *Porphyridium purpureum* (Bory) Drew et Ross, according to irradiance and nutrient availability. *Plant. Cell Environ.* 16:149–59.
- Alhazza, I.M., El-Desoky, G.E. & Al-Othman, Z.A. 2011. Hepatoprotective and hypolipidemic effects of *Spirulina platensis* in rats administered mercuric chloride. *African J. Pharm. Pharmacol.* 5:175–82.
- Almutawa, F., Vandal, R., Wang, S.Q. & Lim, H.W. 2013. Current status of photoprotection by window glass, automobile glass, window films, and sunglasses. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 29:65–72.
- Altamirano, M., Flores-Moya, A. & Figueroa, F.L. 2003. Effects of UV radiation and temperature on growth of germlings of three species of *Fucus* (Phaeophyceae). *Aquat. Bot.* 75:9–20.
- Altamirano, M., Flores-Moya, A., Conde, F. & Figueroa, F.L. 2000. Growth seasonality, photosynthetic pigments, and carbon and nitrogen content in relation to environmental factors: a field study of *Ulva olivascens* (Ulvales, Chlorophyta). *Phycologia.* 39:50–8.
- Alvarez-Gomez, F., Korbee, N. & Figueroa, F.L. 2016. Analysis of antioxidant capacity and bioactive compounds in marine macroalgal and lichenic extracts using different solvents and evaluation methods. *Ciencias Mar.* 42:271–88.
- Anastyuk, S.D., Shevchenko, N.M., Ermakova, S.P., Vishchuk, O.S., Nazarenko, E.L., Dmitrenok, P.S. & Zvyagintseva, T.N. 2012. Anticancer activity *in vitro* of a fucoidan from the brown alga *Fucus evanescens* and its low-molecular fragments, structurally characterized by tandem mass-spectrometry. *Carbohydr. Polym.* 87:186–94.
- Anastyuk, S.D., Shevchenko, N.M., Usoltseva, R. V., Silchenko, A.S., Zadorozhny, P.A., Dmitrenok, P.S. & Ermakova, S.P. 2017. Structural features and anticancer activity *in vitro* of fucoidan derivatives from brown alga *Saccharina cichorioides*. *Carbohydr. Polym.* 157:1503–10.
- Andayani, S., Yuwanita, R. & Izzah, N. 2016. Biofilter Application Using Seaweed (*Gracilaria verrucosa*) to Increase Production of Vannameii Shrimp in Traditional Pond District Bangil-Pasuruan. *Res. J. Life Sci.* 3:16–22.
- Andre, G., Pellegrini, M. & Pellegrini, L. 2001. Algal extracts containing amino acid analogs of mycosporine are useful as dermatological protecting agents against ultraviolet radiation. France. FR2803201.
- Aphalo, P.J., Albert, A., McLeod, A., Heikkilä Anu, Iván, G., López, F.F., Robson, T.M. et al. 2012. Manipulating UV radiation. In *Beyond the Visible: A Handbook of Best Practice in Plant UV Photobiology*. Helsingin yliopisto, pp. 36–70.
- Arad, S., Friedman, O. & Rotem, A. 1988. Effect of nitrogen on polysaccharide production in a *Porphyridium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:2411–4.

- Aráoz, R. & Häder, D.P. 1997. Ultraviolet radiation induces both degradation and synthesis of phycobilisomes in *Nostoc* sp.: a spectroscopic and biochemical approach. *FEMS Microbiol. Ecol.* 23:301–13.
- Ariede, M.B., Candido, T.M., Jacome, A.L.M., Velasco, M.V.R., de Carvalho, J.C.M. & Baby, A.R. 2017. Cosmetic attributes of algae-A review. *Algal Res.* 25:483–7.
- Arts, M. & Rai, H. 1997. Effects of enhanced ultraviolet-B radiation on the production of lipid, polysaccharide and protein in three freshwater algal species. *Freshw. Biol.* 38:597–610.
- Asada, K. 1996. Radical production and scavenging in the chloroplasts. In *Photosynthesis and the Environment*. Springer, pp. 123–50.
- Asada, K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Biol.* 50:601–39.
- Ashby, J., Tinwell, H., Plautz, J., Twomey, K. & Lefevre, P.A. 2001. Lack of binding to isolated estrogen or androgen receptors, and inactivity in the immature rat uterotrophic assay, of the ultraviolet sunscreen filters Tinosorb M-active and Tinosorb S. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 34:287–91.
- Ashokkumar, V., Salim, M.R., Salam, Z., Sivakumar, P., Chong, C.T., Elumalai, S., Suresh, V. et al. 2017. Production of liquid biofuels (biodiesel and bioethanol) from brown marine macroalgae *Padina tetrastomatica*. *Energy Convers. Manag.* 135:351–61.
- Athukorala, Y. & Jeon, Y.J. 2005. Screening for angiotensin 1-converting enzyme inhibitory activity of *Ecklonia cava*. *Prev. Nutr. Food Sci.* 10:134–9.
- Autier, P., Dore, J.F., Reis, A.C., Grivegnée, A., Ollivaud, L., Truchetet, F., Chamoun, E. et al. 2000. Sunscreen use and intentional exposure to ultraviolet A and B radiation: a double blind randomized trial using personal dosimeters. *Br. J. Cancer.* 83:1243–8.
- Babitha, S. & Kim, E.K. 2011. Effect of marine cosmeceuticals on the pigmentation of skin. CRC Press: Boca Raton, FL, USA.
- Bahner, B. 1993. Beta-carotene use grows; natural sector in flux. *Chem. Mark. Rep.* 244:16–7.
- Ballaré, C.L., Scopel, A.L., Stapleton, A.E. & Yanovsky, M.J. 1996. Solar ultraviolet-B radiation affects seedling emergence, DNA integrity, plant morphology, growth rate, and attractiveness to herbivore insects in *Datura ferox*. *Plant Physiol.* 112:161–70.
- Ballottari, M., Dall'Osto, L., Morosinotto, T. & Bassi, R. 2007. Contrasting behavior of higher plant photosystem I and II antenna systems during acclimation. *J. Biol. Chem.* 282:8947–58.
- Balmer, M.E., Buser, H.R., Müller, M.D. & Poiger, T. 2005. Occurrence of some organic UV filters in wastewater, in surface waters, and in fish from Swiss lakes. *Environ. Sci. Technol.* 39:953–62.
- Bandaranayake, W.M. 1998. Mycosporines : are they nature's sunscreens ? *Nat. Prod. Rep.* 15:159–72.
- Banerjee, M. & Häder, D.-P. 1996. Effects of UV radiation on the rice field cyanobacterium, *Aulosira fertilissima*. *Environ. Exp. Bot.* 36:281289–91.
- Baran, R. & Maibach, H.I. 2017. Textbook of cosmetic dermatology. CRC Press.
- Barceló-Villalobos, M., Figueroa, F.L., Korb, N., Álvarez-Gómez, F. & Abreu, M.H. 2017. Production of Mycosporine-Like Amino Acids from *Gracilaria vermiculophylla* (Rhodophyta) Cultured Through One Year in an Integrated Multi-trophic Aquaculture (IMTA) System. *Mar. Biotechnol.* 19:246–54.
- Barry, A.N., Starkenburg, S.R. & Sayre, R. 2017. Strategies for optimizing algal biology for enhanced biomass production. *Adv. Algal Biofuels Res. Eval. Algal Biomass Prod. Convers. Methods into Fuels High Value Co-products.* 6.
- Barton, V., Armeson, K., Hampras, S., Ferris, L.K., Visvanathan, K., Rollison, D. & Alberg, A.J. 2017. Nonmelanoma skin cancer and risk of all-cause and cancer-related mortality: a systematic review. *Arch. Dermatol. Res.* 309:243–51.

- Barufi, J.B., Korbee, N., Oliveira, M.C. & Figueroa, F.L. 2011. Effects of N supply on the accumulation of photosynthetic pigments and photoprotectors in *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta) cultured under UV radiation. *J. Appl. Phycol.* 23:457–66.
- Barufi, J.B., Mata, M.T., Oliveira, M.C. & Figueroa, F.L. 2012. Nitrate reduces the negative effect of UV radiation on photosynthesis and pigmentation in *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta): the photoprotection role of mycosporine-like amino acids. *Phycologia*. 51:636–48.
- Batista González, A.E., Charles, M.B., Mancini-Filho, J. & Vidal Novoa, A. 2009. Las algas marinas como fuentes de fitofármacos antioxidantes. *Rev. Cuba. Plantas Med.* 14:1–18.
- Batista, A.P., Gouveia, L., Bandarra, N.M., Franco, J.M. & Raymundo, A. 2013. Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products. *Algal Res.* 2:164–73.
- Baum, J. & Pitts, D.G. 1997. Posterior subcapsular cataract following intense ultraviolet radiation exposure: a case report. *Eye*. 11:661–2.
- Beardall, J., Roberts, S. & Millhouse, J. 1991. Effects of nitrogen limitation on uptake of inorganic carbon and specific activity of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in green microalgae. *Can. J. Bot.* 69:1146–50.
- Becker, E.W. 2007. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnol. Adv.* 25:207–10.
- Becker, K., Hartmann, A., Ganzera, M., Fuchs, D. & Gostner, J.M. 2016. Immunomodulatory Effects of the Mycosporine-Like Amino Acids Shinorine and Porphyrin-334. *Mar. Drugs*. 14:119.
- Bedoux, G., Hardouin, K., Burlot, A.S. & Bourgoignon, N. 2014. Bioactive components from seaweeds: cosmetic applications and future development. *Adv Bot Res.* 71:345–78.
- Beer, S., Larsson, C., Poryan, O. & Axelsson, L. 2000. Photosynthetic rates of *Ulva* (Chlorophyta) measured by pulse amplitude modulated (PAM) fluorometry. *Eur. J. Phycol.* 35:69–74.
- Benedetti, S., Benvenuti, F., Pagliarini, S., Francogli, S., Scoglio, S. & Canestrari, F. 2004. Antioxidant properties of a novel phycocyanin extract from the blue-green alga *Aphanizomenon flos-aquae*. *Life Sci.* 75:2353–62.
- Benkaddour, S. 2006. Asimilación y biofiltración de fosfatos con macroalgas marinas de interés para el desarrollo de sistemas integrados en acuicultura: efecto de las variaciones en la relación N/P. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, 111 pp.
- Berridge, M. V & Tan, A.S. 1993. Characterization of the cellular reduction of 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch. Biochem. Biophys.* 303:474–82.
- Berridge, M. V, Herst, P.M. & Tan, A.S. 2005. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol. Annu. Rev.* 11:127–52.
- Bhandari, R.R. & Sharma, P.K. 2011. Photosynthetic and biochemical characterization of pigments and UV-absorbing compounds in *Phormidium tenue* due to UV-B radiation. *J. Appl. Phycol.* 23:283–92.
- Bharath Kumar, S. & Prabhasankar, P. 2015. A study on starch profile of rajma bean (*Phaseolus vulgaris*) incorporated noodle dough and its functional characteristics. *Food Chem.* 180:124–32.
- Bhatia, S., Sharma, K., Namdeo, A.G., Chaugule, B.B., Kavale, M. & Nanda, S. 2010. Broad-spectrum sun-protective action of Porphyrin-334 derived from *Porphyra vietnamensis*. *Pharmacognosy Res.* 2:45.
- Biancarosa, I., Espe, M., Bruckner, C.G., Heesch, S., Liland, N., Waagbø, R., Torstensen, B. et al. 2016. Amino acid composition, protein content, and nitrogen-to-protein conversion factors of 21 seaweed species from Norwegian waters. *J. Appl. Phycol.* 1–9.
- Bird, K.T., Habig, C. & DeBusk, T. 1982. Nitrogen allocation and storage patterns in *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyta). *J. Phycol.* 18:344–8.

- Bischof, K., Gomez, I., Molis, M., Hanelt, D., Karsten, U., Lüder, U., Roleda, M.Y. et al. 2006. Ultraviolet radiation shapes seaweed communities. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technology*. 5:141–66.
- Bischof, K., Peralta, G., Kräbs, G., Van De Poll, W.H., Pérez-Lloréns, J.L. & Breeman, A.M. 2002. Effects of solar UV-B radiation on canopy structure of *Ulva* communities from southern Spain. *J. Exp. Bot.* 53:2411–21.
- Biskup, S., Bertocci, I., Arenas, F. & Tuya, F. 2014. Functional responses of juvenile kelps, *Laminaria ochroleuca* and *Saccorhiza polyschides*, to increasing temperatures. *Aquat. Bot.* 113:117–22.
- Bissett, D.L., P Hannon, D. & Orr, T. V 1989. Wavelength dependence of histological, physical, and visible changes in chronically UV-irradiated hairless mouse skin. *Photochem. Photobiol.* 50:763–9.
- Bixler, H.J. & Porse, H. 2011. A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry. *J. Appl. Phycol.* 23:321–35.
- Björkman, O. 1987. Low-temperature chlorophyll fluorescence in leaves and its relationship to photon yield of photosynthesis in photoinhibition. *Photoinhibition*. 123–44.
- Blois, M.S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 188:1199–200.
- Blunt, J.W., Copp, B.R., Keyzers, R.A., Munro, M.H.G. & Prinsep, M.R. 2016. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 30:237–323.
- Blunt, J.W., Copp, B.R., Keyzers, R.A., Munro, M.H.G. & Prinsep, M.R. 2017. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 34:235–94.
- Bold, H.C. & Wynne, M.J. 1978. Introduction to the Algae. Prentice-Hall.
- Bornman, J.F., Barnes, P.W., Robinson, S.A., Ballaré, C.L., Flint, S.D. & Caldwell, M.M. 2015. Solar ultraviolet radiation and ozone depletion-driven climate change: effects on terrestrial ecosystems. *Photochem. Photobiol. Sci.* 14:88–107.
- Borowitzka, M. a. 2013. High-value products from microalgae—their development and commercialisation. *J. Appl. Phycol.* 25:743–56.
- Borowitzka, M.A. 2013. Patents on cyanobacteria and cyanobacterial products and uses. *Cyanobacteria An Econ. Perspect.* 329–38.
- Boukamp, P., Petrussevska, R.T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A. & Fusenig, N.E. 1988. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.* 106:761–71.
- Boulay, C., Abasova, L., Six, C., Vass, I. & Kirilovsky, D. 2008. Occurrence and function of the orange carotenoid protein in photoprotective mechanisms in various cyanobacteria. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1777:1344–54.
- Boussiba, S. & Richmond, A.E. 1980. C-phycocyanin as a storage protein in the blue-green alga *Spirulina platensis*. *Arch. Microbiol.* 125:143–7.
- Bouzon, Z.L. 2006. Histochemistry and ultrastructure of the ontogenesis of the tetrasporangia of *Hypnea musciformis* (Wulfen) J. V. Lamour. (Gigartinales, Rhodophyta). *Rev. Bras. Botânica*. 29:229–38.
- Bowler, C., Montagu, M. van & Inze, D. 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 43:83–116.
- Bozzola, J.J. & Russell, L.D. 1992. Specimen staining and contrast methods for transmission electron microscopy. *Electron Microsc. Princ. Tech. Biol.* 5:117–8.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248–54.
- Brand-Williams, Cuvelier, M.E. & Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Leb. u.-Technol.* 28:S. 25-30.

- Brausch, J.M. & Rand, G.M. 2011. A review of personal care products in the aquatic environment: environmental concentrations and toxicity. *Chemosphere*. 82:1518–32.
- Brennan, L. & Owende, P. 2010. Biofuels from microalgae—a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew. Sustain. energy Rev.* 14:557–77.
- Bridi, R., Crossetti, F.P., Steffen, V.M. & Henriques, A.T. 2001. The antioxidant activity of standardized extract of *Ginkgo biloba* (EGb 761) in rats. *Phyther. Res.* 15:449–51.
- Brinkhuis, B.H., Levine, H.G., Schlenk, C.G. & Tobin, S. 1987. Laminaria cultivation in the far east and North America. *Dev. Aquac. Fish. Sci.*
- Britton, G. & Khachik, F. 2009. Carotenoids in food. In *Carotenoids*. Springer, pp. 45–66.
- Brodie, J., Chan, C.X., De Clerck, O., Cock, J.M., Coelho, S.M., Gachon, C., Grossman, A.R. et al. 2017. The Algal Revolution. *Trends Plant Sci.*
- Brodie, J., Chan, C.X., De Clerck, O., Cock, J.M., Coelho, S.M., Gachon, C., Grossman, A.R. et al. 2017. The Algal Revolution. *Trends Plant Sci.*
- Brooks, J.R., Griffin, V.K. & Kattan, M.W. 1986. A modified method for total carbohydrate analysis of glucose syrups, maltodextrins, and other starch hydrolysis products. *Cereal Chem.* 63:465–6.
- Brosché, M. & Strid, Å. 2003. Molecular events following perception of ultraviolet-B radiation by plants. *Physiol. Plant.* 117:1–10.
- Bryant, J.P., Chapin, F.S., Klein, D.R. & Carbon, D.R. 2012. Carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory. *Oikos*. 40.
- Buck, B.H., Nevejan, N., Wille, M., Chambers, M.D. & Chopin, T. 2017. Offshore and Multi-Use Aquaculture with Extractive Species: Seaweeds and Bivalves. In *Aquaculture Perspective of Multi-Use Sites in the Open Ocean*. Springer, pp. 23–69.
- Buma, A.G.J., Boelen, P. & Jeffrey, W.H. 2003. UVR-induced DNA damage in aquatic organisms. *UV Eff. Aquat. Org. Ecosyst.* 291–327.
- Buma, A.G.J., Hannen, E.J., Roza, L., Veldhuis, M.J.W. & Gieskes, W.W.C. 1995. Monitoring ultraviolet-B-induced dna damage in individual diatom cells by immunofluorescent thymine dimer detection. *J. Phycol.* 31:314–21.
- Burtin, P. 2003. Nutritional value of seaweeds. *Electron. J. Environ. Agric. Food Chem.* 2:498–503.
- Burton, G.W. & Ingold, K.U. 1984. Beta-carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science*. 224:569–73.
- Burton, T., Lyons, H., Lerat, Y., Stanley, M. & Rasmussen, M.B. 2009. A review of the potential of marine algae as a source of biofuel in Ireland.
- Buschmann, A.H., Camus, C., Infante, J., Neori, A., Israel, Á., Hernández-González, M.C., Pereda, S. V et al. 2017. Seaweed production: overview of the global state of exploitation, farming and emerging research activity. *Eur. J. Phycol.* 52:391–406.
- Cabello-Pasini, A., Macías-Carranza, V., Abdala, R., Korb, N. & Figueroa, F.L. 2011. Effect of nitrate concentration and UVR on photosynthesis, respiration, nitrate reductase activity, and phenolic compounds in *Ulva rigida* (Chlorophyta). *J. Appl. Phycol.* 23:363–9.
- Cabrita, M.T., Vale, C. & Rauter, A.P. 2010. Halogenated compounds from marine algae. *Mar. Drugs*. 8:2301–17.
- Calder, P.C. 2015. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Molecular Cell Biol. Lipids*. 1851:469–84.
- Caldwell, M.M. 1971. Solar UV radiation and the growth and development of higher plants. In

- Photophysiology. Current Topics in Photobiology and Photochemistry*. pp. 131–77.
- Capelli, B., Bagchi, D., & Cysewski, G.R. 2013. Synthetic astaxanthin is significantly inferior to algal-based astaxanthin as an antioxidant and may not be suitable as a human nutraceutical supplement. *Nutrafoods*. 12(4):145-152.
- Cardozo, K.H.M., Guaratini, T., Barros, M.P., Falcão, V.R., Tonon, A.P., Lopes, N.P., Campos, S. et al. 2007. Metabolites from algae with economical impact. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 146:60–78.
- Carmona, R., Kraemer, G.P. & Yarish, C. 2006. Exploring Northeast American and Asian species of *Porphyra* for use in an integrated finfish-algal aquaculture system. *Aquaculture*. 252:54–65.
- Carreto, J.I. & Carignan, M.O. 2011. Mycosporine-like amino acids: Relevant secondary metabolites. chemical and ecological aspects. *Mar. Drugs*. 9:387–446.
- Carvalho, A.P. & Malcata, F.X. 2000. Effect of culture media on production of polyunsaturated fatty acids by *Pavlova lutheri*. *Cryptogam. Algal.* 21:59–71.
- Castenmiller, J.J.M., West, C.E., Linssen, J.P.H., van het Hof, K.H. & Voragen, A.G.J. 1999. The food matrix of spinach is a limiting factor in determining the bioavailability of β -carotene and to a lesser extent of lutein in humans. *J. Nutr.* 129:349–55.
- Cavinato, M., Waltenberger, B., Baraldo, G., Grade, C.V.C., Stuppner, H. & Jansen-Dürr, P. 2017. Plant extracts and natural compounds used against UVB-induced photoaging. *Biogerontology*. 1–18.
- Cefali, L.C., Ataide, J.A., Moriel, P., Foglio, M.A. & Mazzola, P.G. 2016. Plant-based active photoprotectants for sunscreens. *Int. J. Cosmet. Sci.* 38:346–53.
- Celis-Plá, P.S.M., Bouzon, Z.L., Hall-Spencer, J.M., Schmidt, E.C., Korbee, N. & Figueroa, F.L. 2016. Seasonal biochemical and photophysiological responses in the intertidal macroalga *Cystoseira tamariscifolia* (Ochrophyta). *Mar. Environ. Res.* 115:89–97.
- Cerantola, S., Breton, F., Ar Gall, E. & Deslandes, E. 2006. Co-occurrence and antioxidant activities of fucol and fucophlorethol classes of polymeric phenols in *Fucus spiralis*. *Bot. Mar.* 49:347–51.
- Cervellon, M.C., Rinaldi, M.J. & Wernerfelt, A.S. 2011. How Green is Green? Consumers' understanding of green cosmetics and their certifications'. In *Proceedings of 10th International Marketing Trends Conference*. pp. 20–1.
- Chaiklahan, R., Chirasuwan, N. & Bunnag, B. 2012. Stability of phycocyanin extracted from *Spirulina* sp.: Influence of temperature, pH and preservatives. *Process Biochem.* 47:659–64.
- Chan, P.T., Matanjun, P., Yasir, S.M. & Tan, T.S. 2014. Antioxidant activities and polyphenolics of various solvent extracts of red seaweed, *Gracilaria changii*. *J. Appl. Phycol.* 27:2377–86.
- Chatelain, E. & Gabard, B. 2001. Photostabilization of Butyl methoxydibenzoylmethane (Avobenzone) and Ethylhexyl methoxycinnamate by Bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine (Tinosorb S), a New UV Broadband Filter. *Photochem. Photobiol.* 74:401–6.
- Chen, H., Zhou, D., Luo, G., Zhang, S. & Chen, J. 2015. Macroalgae for biofuels production: Progress and perspectives. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 47:427–37.
- Chen, H.W., Yang, T.S., Chen, M.J., Chang, Y.C., Eugene, I., Wang, C., Ho, C.L. et al. 2014. Purification and immunomodulating activity of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* cultured using power plant flue gas. *Process Biochem.* 49:1337–44.
- Cherng, S.C., Cheng, S.N., Tarn, A. & Chou, T.C. 2007. Anti-inflammatory activity of c-phycocyanin in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Life Sci.* 81:1431–5.
- Chisti, Y. 2006. Microalgae as sustainable cell factories. *Environ. Eng. Manag. J.* 5.
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25:294–306.

- Cho, Y., Kim, H. & Kim, S.K. 2013. Bioethanol production from brown seaweed, *Undaria pinnatifida*, using NaCl acclimated yeast. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 36:713–9.
- Choi, S.Y., Park, M.K., Choi, J., Koh, E.J., Seo, Y.J., Song, J.H., Chei, S. et al. 2017. The synergistic anti-obesity effect of *Gelidium elegans* extract and orlistat *in vivo* and *in vitro*. *FASEB J.* 31:610–46.
- Choi, Y.H., Yang, D.J., Kulkarni, A., Moh, S.H. & Kim, K.W. 2015. Mycosporine-Like Amino Acids Promote Wound Healing through Focal Adhesion Kinase (FAK) and Mitogen-Activated Protein Kinases (MAP Kinases) Signaling Pathway in Keratinocytes. *Mar. Drugs.* 13:7055–66.
- Chopin, T., Buschmann, A.H., Halling, C., Troell, M., Kautsky, N., Neori, A., Kraemer, G.P. et al. 2001. Integrating seaweeds into marine aquaculture systems: A key toward sustainability. *J. Phycol.* 37:975–86.
- Christaki, E., Bonos, E., Giannenas, I., Florou-Paneria, P., Giannenas, I., Florou-Paneri, P., Giannenas, I. et al. 2013. Functional properties of carotenoids originating from algae. *J. Sci. Food Agric.* 93:5–11.
- Christaki, E., Karatzia, M. & Florou-Paneri, P. 2010. The use of algae in animal nutrition. *J. Hell. Vet Med Soc.* 61:267–76.
- Christenson, L. & Sims, R. 2011. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnol. Adv.* 29:686–702.
- Christie, W.W. 1982. A simple procedure for rapid transmethylolation of glycerolipids and cholesteryl esters. *J. Lipid Res.* 23:1072–5.
- Chung, H.Y., Ma, W.C.J., Ang, P.O., Kim, J.S. & Chen, F. 2003. Seasonal variations of bromophenols in brown algae (*Padina arborescens*, *Sargassum siliquastrum*, and *Lobophora variegata*) collected in Hong Kong. *J. Agric. Food Chem.* 51:2619–24.
- Chung, I.K., Beardall, J., Mehta, S., Sahoo, D. & Stojkovic, S. 2011. Using marine macroalgae for carbon sequestration: a critical appraisal. *J. Appl. Phycol.* 23:877–86.
- Clarkson, P.M. 1995. Antioxidants and physical performance. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 35:131–41.
- Colipa 2011. In vitro method for the determination of the UVA protection factor and “critical wavelength” values of sunscreen products. Brussels.
- Colla, L.M., Bertolin, T.E. & Costa, J.A.V. 2004. Fatty acids profile of *Spirulina platensis* grown under different temperatures and nitrogen concentrations. *Zeitschrift für Naturforsch. C.* 59:55–9.
- Conchillo, A., Valencia, I., Puente, A., Ansorena, D. & Astiasarán, I. 2006. Componentes funcionales en aceites de pescado y de alga. *Nutr. Hosp.* 21:369–73.
- Connan, S., Delisle, F., Deslandes, E. & Ar Gall, E. 2006. Intra-thallus phlorotannin content and antioxidant activity in Phaeophyceae of temperate waters. *Bot. Mar.* 49:39–46.
- Cornish, M.L. & Garbary, D.J. 2010. Antioxidants from macroalgae: potential applications in human health and nutrition. *Algae.* 25:155–71.
- Cottet, M.J. 1965. Dosage des lipides sériques par la méthode sulfo-phosphovanillique (1) de E Chabrol et R. Charonnat. *Académie Natl. Médecine.* 149:331–8.
- Courtois, J. 2009. Oligosaccharides from land plants and algae: production and applications in therapeutics and biotechnology. *Curr. Opin. Microbiol.* 12:261–73.
- Craigie, J.S., MacKinnon, S.L. & Walter, J.A. 2008. Liquid seaweed extracts identified using ¹H NMR profiles. *J. Appl. Phycol.* 20:665–71.
- Cremades, J., Guerrero, S. & Salinas, J. 2010. Acuicultura multitrófica en Galicia basada en macroalgas. In *Macroalgas En La Acuicultura Multitrófica Integrada Peninsular. Valorización de Su Biomasa*. Fundación CETMAR, Vigo, España, pp. 28–21.
- Croteau, R., Kutchan, T.M. & Lewis, N.G. 2000. Natural products (secondary metabolites). *Biochem. Mol.*

- Biol. plants.* 24:1250–319.
- Cuadra, P., Harborne, J.B. & Waterman, P.G. 1997. Increases in surface flavonols and photosynthetic pigments in *Gnaphalium luteo-album* in response to UV-B radiation. *Phytochemistry*. 45:1377–83.
- D'Elia, C.F. & DeBoer, J.A. 1978. Nutritional studies of two red algae. II. Kinetics of ammonium and nitrate uptake, 2. *J. Phycol.* 14:266–72.
- Dang, H.T., Lee, H.J., Yoo, E.S., Shinde, P.B., Lee, Y.M., Hong, J., Kim, D.K. et al. 2008. Anti-inflammatory constituents of the red alga *Gracilaria verrucosa* and their synthetic analogues. *J. Nat. Prod.* 71:232–40.
- Danovaro, R., Bongiorno, L., Corinaldesi, C., Giovannelli, D., Damiani, E., Astolfi, P., Greci, L. et al. 2008. Sunscreens cause coral bleaching by promoting viral infections. *Environ. Health Perspect.* 116:441.
- Dantagnan, P., Hernández, A., Borquez, A. & Mansilla, A. 2009. Inclusion of macroalgae meal (*Macrocystis pyrifera*) as feed ingredient for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effect on flesh fatty acid composition. *Aquac. Res.* 41:87–94.
- Darlenski, R. & Fluhr, J.W. 2017. Measurement of skin surface acidity: measuring skin pH. *Agache's Meas. Ski. Non-invasive Investig. Physiol. Norm. Constants.* 113–20.
- Daroch, M., Geng, S. & Wang, G. 2013. Recent advances in liquid biofuel production from algal feedstocks. *Appl. Energy*. 102:1371–81.
- Davies, K.J.A. 1995. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. In *Biochemical Society Symposia*. Portland Press Limited, pp. 1–31.
- Davies, M.J., Forni, L.G. & Willson, R.L. 1988. Vitamin E analogue Trolox CEsr and pulse-radiolysis studies of free-radical reactions. *Biochem. J.* 255:513.
- Davison, I.R., Jordan, T.L., Fegley, J.C. & Grobe, C.W. 2007. Response of *Laminaria saccharina* (Phaeophyta) growth and photosynthesis to simultaneous ultraviolet radiation and nitrogen limitation. *J. Phycol.* 43:636–46.
- Day, J.G., Slocombe, S.P. & Stanley, M.S. 2012. Overcoming biological constraints to enable the exploitation of microalgae for biofuels. *Bioresour. Technol.* 109:245–51.
- De Fabo, E.C. & Kripke, M.L. 1980. Wavelength Dependence and Dose-Rate Independence of UV Radiation-Induced Immunologic Unresponsiveness of Mice to a UV-Induced Fibrosarcoma. *Photochem. Photobiol.* 32:183–8.
- De Gruijl, F.R. & Van der Leun, J.C. 1994. Estimate of the wavelength dependency of ultraviolet carcinogenesis in humans and its relevance to the risk assessment of a stratospheric ozone depletion. *Health Phys.* 67:319–25.
- De la Coba, F. 2007. Evaluación de la capacidad fotoprotectora y antioxidante de aminoácidos tipo micosporina. Aplicaciones biotecnológicas. Universidad de Málaga, 294 pp.
- De la Coba, F., Aguilera, J., De Galvez, M. V., Alvarez, M., Gallego, E., Figueroa, F.L., Herrera, E. et al. 2009. Prevention of the ultraviolet effects on clinical and histopathological changes, as well as the heat shock protein-70 expression in mouse skin by topical application of algal UV-absorbing compounds. *J. Dermatol. Sci.* 55:161–9.
- De La Coba, F., Aguilera, J., Figueroa, F.L., De Gálvez, M. V. & Herrera, E. 2009. Antioxidant activity of mycosporine-like amino acids isolated from three red macroalgae and one marine lichen. *J. Appl. Phycol.* 21:161–9.
- De Marsac, N.T. & Houmard, J. 1993. Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps towards molecular mechanisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 10:119–89.
- De Mora, S., Demers, S. & Vernet, M. 2000. The effects of UV radiation in the marine environment. Cambridge University Press.

- De Oliveira, E.M., Schmidt, É.C., Pereira, D.T., Bouzon, Z.L. & Ouriques, L.C. 2016. Effects of UV-B radiation on germlings of the red macroalga *Nemalion helminthoides* (Rhodophyta). *J. Microsc. Ultrastruct.* 4:85–94.
- DeBoer, J.A. & Ryther, J.H. 1977. Potential yields from a waste-recycling algal mariculture system. *Mar. plant biomass Pacific northwest coast.* 231–48.
- Demmig-Adams, B. & Adams, W. 1996. The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends Plant Sci.* 1:21–6.
- Deniaud-Bouët, E., Hardouin, K., Potin, P., Kloareg, B. & Hervé, C. 2017. A review about brown algal cell walls and fucose-containing sulfated polysaccharides: cell wall context, biomedical properties and key research challenges. *Carbohydr. Polym.* 175:395–408.
- Denizot, F. & Lang, R. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods.* 89:271–7.
- Devasagayam, T.P.A., Tilak, J.C., Bloor, K.K., Sane, K.S., Ghaskadbi, S.S. & Lele, R.D. 2004. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *Japi.* 52:794–804.
- Dillon, J.G., Tatsumi, C.M., Tandingan, P.G. & Castenholz, R.W. 2002. Effect of environmental factors on the synthesis of scytonemin, a UV-screening pigment, in a cyanobacterium (*Chroococcidiopsis* sp.). *Arch. Microbiol.* 177:322–31.
- Döhler, G., Hagmeier, E. & David, C. 1995. Effects of solar and artificial UV irradiation on pigments and assimilation of 15 N ammonium and 15 N nitrate by macroalgae. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 30:179–87.
- Dragone, G., Fernandes, B.D., Abreu, A.P., Vicente, A.A. & Teixeira, J.A. 2011. Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. *Appl. Energy.* 88:3331–5.
- Duan, X.J., Zhang, W.W., Li, X.M. & Wang, B.G. 2006. Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*. *Food Chem.* 95:37–43.
- Duarte, C.M. 1992. Nutrient concentration of aquatic plants: Patterns across species. *Limnol. Oceanogr.* 37:882–9.
- Dufossé, L., Galaup, P., Yaron, A., Arad, S.M., Blanc, P., Murthy, K.N.C. & Ravishankar, G.A. 2005. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? *Trends Food Sci. Technol.* 16:389–406.
- Dunlap, W.C. & Yamamoto, Y. 1995. Small-molecule antioxidants in marine organisms: Antioxidant activity of mycosporine-glycine. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 112:105–14.
- Eaton, L., Clezy, K., Snellgrove, D. & Sloman, K. 2016. The behavioural effects of supplementing diets with synthetic and naturally sourced astaxanthin in an ornamental fish (*Puntius titteya*). *Appl. Anim. Behav. Sci.* 182:94–100.
- Egner, P.A., Muñoz, A. & Kensler, T.W. 2003. Chemoprevention with chlorophyllin in individuals exposed to dietary aflatoxin. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 523:209–16.
- Eilers, P.H.C & Peeters, J.C.H. 1988. A model for the relationship between light intensity and the rate of photosynthesis in phytoplankton. *Ecol. Modell.* 42:199–215.
- Eisenbrand, G., Pool-Zobel, B., Baker, V., Balls, M., Blaauboer, B.J., Boobis, A., Carere, A. et al. 2002. Methods of *in vitro* toxicology. *Food Chem. Toxicol.* 40:193–236.
- Enríquez, S., Agustí, S. & Duarte, C.M. 1994. Light absorption by marine macrophytes. *Oecologia.* 98:121–9.
- Enriquez, S., Duarte, C.M. & Sand-Jensen, K. 1995. Patterns in the photosynthetic metabolism of Mediterranean macrophytes. *Oceanogr. Lit. Rev.* 11:992.

- Eppink, M.H.M., Olivieri, G., Reith, H., van den Berg, C., Barbosa, M.J. & Wijffels, R.H. 2017. From Current Algae Products to Future Biorefinery Practices: A Review.
- Eriksen, N.T. 2008. Production of phycocyanin—a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80:1–14.
- Erwes, P., & Tiago, P. 2014. Marine bio-resources for a new blue economy.” Final Report. *BioMarine Business Convention*.
- Eswaran, K., Mairh, O.P. & Rao, P.V.S. 2002. Inhibition of pigments and phycocolloid in a marine red alga *Gracilaria edulis* by ultraviolet-B radiation. *Biol. Plant.* 45:157–9.
- Fabregas, J. & Herrero, C. 1990. Vitamin content of four marine microalgae. Potential use as source of vitamins in nutrition. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 5:259–63.
- Falkowski, P.G. & Raven, J.A. 2013. Aquatic photosynthesis. Princeton University Press.
- Fang, J., Zhang, J., Xiao, T., Huang, D. & Liu, S. 2016. Integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) in Sanggou Bay, China. *Aquac. Environ. Interact.* 8:201–5.
- FAO 2016. Contributing to food security and nutrition for all. *In The State of World Fisheries and Aquaculture 2016*. Roma, p. 200.
- Farasat, M., Khavari-Nejad, R.A., Nabavi, S.M.B. & Namjooyan, F. 2014. Antioxidant activity, total phenolics and flavonoid contents of some edible green seaweeds from northern coasts of the Persian gulf. *Iran. J. Pharm. Res.* 13:163–70.
- Fatland, B.L., Ke, J., Anderson, M.D., Mentzen, W.I., Cui, L.W., Allred, C.C., Johnston, J.L. et al. 2002. Molecular characterization of a heteromeric ATP-citrate lyase that generates cytosolic acetyl-coenzyme A in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 130:740–56.
- Fedoroff, N. V, Battisti, D.S., Beachy, R.N., Cooper, P.J.M., Fischhoff, D.A., Hodges, C.N., Knauf, V.C. et al. 2010. Radically rethinking agriculture for the 21st century. *Science.* 327:833–4.
- Fent, K., Zenker, A. & Rapp, M. 2010. Widespread occurrence of estrogenic UV-filters in aquatic ecosystems in Switzerland. *Environ. Pollut.* 158:1817–24.
- Fernand, F., Israel, A., Skjermo, J., Wichard, T., Timmermans, K.R. & Golberg, A. 2017. Offshore macroalgae biomass for bioenergy production: Environmental aspects, technological achievements and challenges. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 75:35–45.
- Fernandes, S.C.M., Alonso-Varona, A., Palomares, T., Zubillaga, V., Labidi, J. & Bulone, V. 2015. Exploiting mycosporines as natural molecular sunscreens for the fabrication of UV-absorbing green materials. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 7:16558–64.
- Fernando, I.P.S., Nah, J.W. & Jeon, Y.J. 2016. Potential anti-inflammatory natural products from marine algae. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 48:22–30.
- Fernando, I.P.S.P.S., Kim, M., Son, K.T., Jeong, Y. & Jeon, Y.J. 2016. Antioxidant activity of marine algal polyphenolic compounds: a mechanistic Approach. *J. Med. Food.* 19:jmf.2016.3706.
- Ferruzzi, M.G. & Blakeslee, J. 2007. Digestion, absorption, and cancer preventative activity of dietary chlorophyll derivatives. *Nutr. Res.* 27:1–12.
- Figueroa, F. & Viñegla, B. 2001. Effects of solar UV radiation on photosynthesis and enzyme activities (carbonic anhydrase and nitrate reductase) in marine macroalgae from southern Spain. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 74:237–49.
- Figueroa, F., Conde-Alvarez, R. & Gomez, I. 2003. Relations between electron transport rates determined by pulse amplitude modulated chlorophyll fluorescence and oxygen evolution in macroalgae under different light conditions. *Photosynth. Res.* 75:259–75.
- Figueroa, F., Salles, S., Aguilera, J., Jiménez, C., Mercado, J., Viñegla, B., Flores-Moya, A. et al. 1997. Effects of solar radiation on photoinhibition and pigmentation in the red alga *Porphyra leucosticta*.

- Mar. Ecol. Prog. Ser.* 151:81–90.
- Figueroa, F.L. & Gomez, I. 2001. Photosynthetic acclimation to solar UV radiation of marine red algae from the warm-temperate coast of southern Spain: A review. *J Appl Phycol.* 13:235–48.
- Figueroa, F.L. & Niell, F.X. 1991. Photocontrol of chlorophyll and biliprotein synthesis in seaweeds: possible photoreceptors and ecological considerations. *Sci. Mar.* 55:519–27.
- Figueroa, F.L. 1996. Effects of light quality on nitrate reductase and glutamine synthetase activities in the red alga *Porphyra leucosticta* Thur in Le Jol. and other macroalgae. *Sci. Mar.* 60:163–70.
- Figueroa, F.L., Aguilera, J. & Niell, F.X. 1995. Red and blue light regulation of growth and photosynthetic metabolism in *Porphyra umbilicalis* (Bangiales, Rhodophyta). *Eur. J. Phycol.* 30:11–8.
- Figueroa, F.L., Álvarez-Gómez, F., del Rosal, Y., Celis-Plá, P.S.M., González, G., Hernández, M. & Korbee, N. 2017. In situ photosynthetic yields of cave photoautotrophic biofilms using two different Pulse Amplitude Modulated fluorometers. *Algal Res.* 22:104–15.
- Figueroa, F.L., Bueno, A., Korbee, N., Santos, R., Mata, L. & Schuenhoff, A. 2008. Accumulation of Mycosporine-like Amino Acids in *Asparagopsis armata* Grown in Tanks with Fishpond Effluents of Gilthead Sea Bream, *Sparus aurata*. *J. World Aquac. Soc.* 39:692–9.
- Figueroa, F.L., Conde-Alvarez, R., Gomez, I. & Gómez, I. 2003. Relations between electron transport rates determined by pulse amplitude modulated chlorophyll fluorescence and oxygen evolution in macroalgae under different light conditions. *Photosynth. Res.* 75:259–75.
- Figueroa, F.L., Domínguez-González, B. & Korbee, N. 2014. Vulnerability and acclimation to increased UVB radiation in three intertidal macroalgae of different morpho-functional groups. *Mar. Environ. Res.* 97:30–8.
- Figueroa, F.L., Israel, a., Neori, a., Martínez, B., Malta, E.J., Put, a., Inken, S. et al. 2010. Effect of nutrient supply on photosynthesis and pigmentation to short-term stress (UV radiation) in *Gracilaria conferta* (Rhodophyta). *Mar. Pollut. Bull.* 60:1768–78.
- Figueroa, F.L., Israel, A., Neori, A., Martínez, B., Malta, E., Ang Jr, P., Inken, S. et al. 2009. Effects of nutrient supply on photosynthesis and pigmentation in *Ulva lactuca* (Chlorophyta): responses to short-term stress. *Aquat. Biol.* 7:173–83.
- Figueroa, F.L., Jerez, C.G. & Korbee, N. 2013. Use of *in vivo* chlorophyll fluorescence to estimate photosynthetic activity and biomass productivity in microalgae grown in different culture systems. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 41:801–19.
- Figueroa, F.L., Korbee, N., Abdala, R., Jerez, C.G., López-de la Torre, M., Güenaga, L., Larrubia, M. a. et al. 2012. Biofiltration of fishpond effluents and accumulation of N-compounds (phycobiliproteins and mycosporine-like amino acids) versus C-compounds (polysaccharides) in *Hydropuntia cornea* (Rhodophyta). *Mar. Pollut. Bull.* 64:310–8.
- Figueroa, F.L., Martínez, B., Israel, A., Neori, A., Malta, E.J., Ang, P., Inken, S. et al. 2009. Acclimation of Red Sea macroalgae to solar radiation: Photosynthesis and thallus absorptance. *Aquat. Biol.* 7:159–72.
- Figueroa, F.L., NygAard, C., Ekelund, N. & Gómez, I. 2003. Photobiological characteristics and photosynthetic UV responses in two *Ulva* species (Chlorophyta) from southern Spain. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 72:35–44.
- Figueroa, F.L., Santos, R., Conde-Álvarez, R., Mata, L., Gómez Pinchetti, J.L., Matos, J., Huovinen, P. et al. 2006. The use of chlorophyll fluorescence for monitoring photosynthetic condition of two tank-cultivated red macroalgae using fishpond effluents. *Bot. Mar.* 49:275–82.
- Fitzgerald, R.J. & Murray, B.A. 2006. Bioactive peptides and lactic fermentations. *Int. J. Dairy Technol.* 59:118–25.
- Flameling, I.A. & Kromkamp, J. 1998. Light dependence of quantum yields for PSII charge separation and

- oxygen evolution in eucaryotic algae. *Limnol. Oceanogr.* 43:284–97.
- Fleita, D., El-Sayed, M. & Rifaat, D. 2015. Evaluation of the antioxidant activity of enzymatically-hydrolyzed sulfated polysaccharides extracted from red algae; *Pterocladia capillacea*. *LWT-Food Sci. Technol.* 63:1236–44.
- Fleurence, J. 1999. Seaweed proteins: Biochemical, nutritional aspects and potential uses. *Trends Food Sci. Technol.* 10:25–8.
- Fleurence, J. 2004. Seaweed proteins. In Yada, R. Y. *Proteins in Food Processing*. pp. 197–213.
- Flint, S.D. & Caldwell, M.M. 2003. A biological spectral weighting function for ozone depletion research with higher plants. *Physiol. Plant.* 117:137–44.
- Flodin, C., Helidoniotis, F. & Whitfield, F.B. 1999. Seasonal variation in bromophenol content and bromoperoxidase activity in *Ulva lactuca*. *Phytochemistry*. 51:135–8.
- Floegel, A., Kim, D.O., Chung, S.J., Koo, S.I. & Chun, O.K. 2011. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *J. Food Compos. Anal.* 24:1043–8.
- Flores-Moya, A., Gomez, I., Vinegla, B., Altamirano, M., Perez-Rodriguez, E., Maestre, C., Caballero, R.M. et al. 1998. Effects of solar radiation on the endemic Mediterranean red alga *Rissoella verruculosa*: photosynthetic performance, pigment content and the activities of enzymes related to nutrient uptake. *New Phytol.* 139:673–83.
- Flores-Moya, A., Hanelt, D., Figueroa, F.L., Altamirano, M., Viñegla, B. & Salles, S. 1999. Involvement of solar UV-B radiation in recovery of inhibited photosynthesis in the brown alga *Dictyota dichotoma* (Hudson) Lamouroux. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 49:129–35.
- Floreto, E.A.T. & Teshima, S. 1998. The fatty acid composition of seaweeds exposed to different levels of light intensity and salinity. *Bot. Mar.* 41:467–82.
- Floreto, E.A.T., Hirata, H., Ando, S. & Yamasaki, S. 1993. Fatty acid composition of *Ulva pertusa* Kjellman (Chlorophyta) and *Gracilaria incurvata* Okamura (Rhodophyta) in Japanese coastal waters. *Bot. Mar.* 36:217–22.
- Florez, N., Jesus Gonzalez-Munoz, M., Ribeiro, D., Fernandes, E., Dominguez, H. & Freitas, M. 2017. Algae Polysaccharides' Chemical Characterization and their Role in the Inflammatory Process. *Curr. Med. Chem.* 24:149–75.
- Folch, J., Lees, M. & Sloane-Stanley, G.H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226:497–509.
- Folin, O. & Ciocalteau, V. 1927. Tyrosine and Tryptophane in Proteins. *J. Biol. Chem.* 73:627–48.
- Forján, E., Garbayo, I., Henriques, M., Rocha, J., Vega, J.M. & Vílchez, C. 2011. UV-A mediated modulation of photosynthetic efficiency, xanthophyll cycle and fatty acid production of *Nannochloropsis*. *Mar. Biotechnol.* 13:366–75.
- Formo, M.W. 1954. Ester reactions of fatty materials. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 31:548–59.
- Forster, J. & Radulovich, R. 2015. Seaweed and food security. *Fish. (marine, 79.7 Mt; freshwater, 11.6 Mt)*. 91:0–1.
- Frankel, E.N. & Finley, J.W. 2008. How to standardize the multiplicity of methods to evaluate natural antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* 56:4901–8.
- Franklin, L. & Forster, R. 1997. The changing irradiance environment: consequences for marine macrophyte physiology, productivity and ecology. *Eur. J. Phycol.* 32:207–32.
- Franklin, L.A. & Badger, M.R. 2001. A comparison of photosynthetic electron transport rates in macroalgae measured by pulse amplitude modulated chlorophyll fluorometry and mass spectrometry. *J. Phycol.* 37:756–67.

- Franklin, L.A., Kräbs, G. & Kuhlenskamp, R. 2001. Blue light and UV-A radiation control the synthesis of mycosporine-like amino acids in *Chondrus crispus* (Florideophyceae). *J. Phycol.* 37:257–70.
- Franklin, L.A., Yakovleva, I., Karsten, U. & Lüning, K. 1999. Synthesis of mycosporine-like amino acids in *Chondrus crispus* (Florideophyceae) and the consequences for sensitivity to ultraviolet B radiation. *J. Phycol.* 35:682–93.
- Freedman, B., Butterfield, R.O. & Pryde, E.H. 1986. Transesterification kinetics of soybean oil 1. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 63:1375–80.
- Freile-Pelegrin, Y. & Robledo, D. 2014. Bioactive Phenolic Compounds from Algae. In *Bioactive Compounds from Marine Food*. 1st ed., p. 467.
- Fridovich, I. 1986. Biological effects of the superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys.* 247:1–11.
- Friedlander, M. & Zelikovitch, N. 1984. Growth rates, phycocolloid yield and quality of the red seaweeds, *Gracilaria* sp., *Pterocladia capillacea*, *Hypnea musciformis*, and *Hypnea cornuta*, in field studies in Israel. *Aquaculture*. 40:57–66.
- Fryer, M.J. 1992. The antioxidant effects of thylakoid Vitamin E (α -tocopherol). *Plant. Cell Environ.* 15:381–92.
- Gad-Shayne, C. 1999. Alternatives to *in vivo* studies in toxicology. *Gen. Appl. Toxicol.* 1:178.
- Gambichler, T., Rooms, I. & Scholl, L. 2016. Photoprotection by Clothing and Fabric. In *Principles and Practice of Photoprotection*. Springer, pp. 417–28.
- Gao, G., Zhong, Z., Zhou, X. & Xu, J. 2016. Changes in morphological plasticity of *Ulva prolifera* under different environmental conditions: A laboratory experiment. *Harmful Algae*. 59:51–8.
- Gao, K., Wu, Y., Li, G., Wu, H., Villafane, V.E. & Helbling, E.W. 2007. Solar UV radiation drives CO₂ fixation in marine phytoplankton: a double-edged sword. *Plant Physiol.* 144:54–9.
- García-Pichel, F., Wingard, C.E. & Castenholz, R.W. 1993. Evidence regarding the UV sunscreen role of a mycosporine-like compound in the cyanobacterium *Gloeocapsa* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:170–6.
- García-Reina, G., Gómez-Pinchetti, J.L., Robledo, D. & Sosa, P. 1991. Actual, potential and speculative applications of seaweed cellular biotechnology: some specific comments on *Gelidium*. *Hydrobiologia*. 221:181–94.
- García-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A. & Fernández-Gutiérrez, A. 2010. Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. *Molecules*. 15:8813–26.
- García-Sánchez, M.J., Fernández, J.A. & Niell, F.X. 1993. Biochemical and physiological responses of *Gracilaria tenuistipitata* under two different nitrogen treatments. *Physiol. Plant.* 88:631–7.
- Gardeva, E., Toshkova, R., Yossifova, L., Minkova, K., Ivanova, N. & Gigova, L. 2014. Antitumor activity of C-phycocyanin from *Arthrocnemum africanum* (Cyanophyceae). *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 57:675–84.
- Ge, L., Wang, P. & Mou, H. 2011. Study on saccharification techniques of seaweed wastes for the transformation of ethanol. *Renew. energy*. 36:84–9.
- Ge, S. & Champagne, P. 2017. Cultivation of the marine macroalgae *Chaetomorpha linum* in municipal wastewater for nutrient recovery and biomass production. *Environ. Sci. Technol.* 51:3558–66.
- Geider, R., Macintyre, Graziano, L. & McKay, R.M. 1998. Responses of the photosynthetic apparatus of *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) to nitrogen and phosphorus limitation. *Eur. J. Phycol.* 33:315–32.
- Genty, B., Briantais, J.M. & Baker, N.R. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 990:87–92.

- Gibbsl, N.K., Norva, M., Traynorl, N.J., Wolf, M., Johnson, B.E. & Crosby, J. 1993. Action spectra for the trans to cis photoisomerisation. *Photochem. Photobiol.* 57:584–90.
- Gil Jérez, C.M. 2015. Photosynthetic performance and biomass composition of *Chlorella fusca* (Chlorophyta) in thin-layer cascades: Possible biotechnological applications. Servicio de Publicaciones y Divulgación Científica, 279 pp.
- Gilaberte, Y., Coscojuela, C., de Santamaría, M.C.S. & González, S. 2003. Fotoprotección. *Actas Dermosifiliogr.* 94:271–93.
- Gilbert, M., Wilhelm, C. & Richter, M. 2000. Bio-optical modelling of oxygen evolution using *in vivo* fluorescence: Comparison of measured and calculated photosynthesis/irradiance (PI) curves in four representative phytoplankton species. *J. Plant Physiol.* 157:307–14.
- Goes, J.I., Handa, N., Taguchi, S. & Hama, T. 1994. Effect of UV-B radiation on the fatty acid composition of the marine phytoplankter *Tetraselmis* sp.: relationship to cellular pigments. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 259–74.
- Goh, C.S. & Lee, K.T. 2010. A visionary and conceptual macroalgae-based third-generation bioethanol (TGB) biorefinery in Sabah, Malaysia as an underlay for renewable and sustainable development. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14:842–8.
- Goldberg, D.M. & Spooner, R.J. 1983. Glutathione reductase. *Methods Enzym. Anal.* 3:258–65.
- Gómez Ordóñez, E. 2012. Evaluación nutricional y propiedades biológicas de algas marinas comestibles. Estudios “*in vitro*” e “*in vivo*.” Universidad Complutense de Madrid, 218 pp.
- Gómez Pinchetti, J.L., Suárez Álvarez, S., Güenaga Unzetabarrenechea, L., Figueroa, F.L. & García Reina, G. 2011. Posibilidades para el desarrollo de sistemas integrados con macroalgas en las Islas Canarias y su entorno. In *Macroalgas En La Acuicultura Multitrófica Integrada Peninsular*. Centro Tecnológico del Mar – Fundación CETMAR, Vigo, pp. 75–93.
- Gómez, I. & Figueroa, F.L. 1998. Effects of solar UV stress on chlorophyll fluorescence kinetics of intertidal macroalgae from southern Spain: a case study in *Gelidium* species. *J. Appl. Phycol.* 10:285–94.
- Gómez, I. & Huovinen, P. 2011. Morpho-functional patterns and zonation of South Chilean seaweeds: the importance of photosynthetic and bio-optical traits. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 422:77–91.
- Gómez-Pinchetti, J.L., Suárez Alvarez, S., Martel Quintana, A. & García Reina, G. 2002. Alternative high-value seaweed species as biofilters for the purification of N–NH₄⁺ enriched fishpond effluents. *Algal Biotechnol. a sea Oppor.* 267.
- González-González, R. 2010. Cultivo y valoración de *Hydropuntia cornea* (Rhodophyta) y *Ulva rigida* (Chlorophyta) para la producción de biodiesel: dinámica de la disponibilidad de amonio y de las condiciones de irradiación sobre la calidad de la biomasa. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, 67 pp.
- Gordon, E.M. & McCandless, E.L. 1973. Ultrastructure and hi stochemistry of *Chondrus crispus* Stackhouse. *Nov. Scotian Inst Sci Proc.*
- Gordon-mills, E.M., Tast, J. & Mccandlesst, E.L. 1978. Carrageenans in the cell walls of *Chondrus crispus* Stack. (Rhodophyceae , Gigartinales). *Phycologia.* 17:95–104.
- Gorman, L., Kraemer, G.P., Yarish, C., Boo, S.M. & Kim, J.K. 2017. The effects of temperature on the growth rate and nitrogen content of invasive *Gracilaria vermiculophylla* and native *Gracilaria tikvahiae* from Long Island Sound, USA. *Algae.* 32:57–66.
- Goss, R. & Jakob, T. 2010. Regulation and function of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in algae. *Photosynth. Res.* 106:103–22.
- Grassi, G., Colom, M.R. & Minotta, G. 2001. Effects of nutrient supply on photosynthetic acclimation and photoinhibition of one-year-old foliage of *Picea abies*. *Physiol. Plant.* 111:245–54.

- Grauffel, V., Kloareg, B., Mabeau, S., Durand, P. & Jozefonvicz, J. 1989. New natural polysaccharides with potent antithrombic activity: fucans from brown algae. *Biomaterials*. 10:363–8.
- Gribble, G.W. 1998. Naturally occurring organohalogen compounds. *Acc. Chem. Res.* 31:141–52.
- Griffiths, M., Harrison, S.T.L., Smit, M. & Maharajh, D. 2016. Major commercial products from micro-and macroalgae. In *Algae Biotechnology*. Springer, pp. 269–300.
- Griffiths, M.J. & Harrison, S.T.L. 2009. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *J. Appl. Phycol.* 21:493–507.
- Grobbelaar, J.U. 2009. Factors governing algal growth in photobioreactors: the “open” versus “closed” debate. *J. Appl. Phycol.* 21:489.
- Grobe, C.W. & Murphy, T.M. 1998. Solar ultraviolet-B radiation effects on growth and pigment composition of the intertidal alga *Ulva expansa* (Setch.) S. & G. (Chlorophyta). *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 225:39–51.
- Gröniger, A., Sinha, R.P., Klisch, M. & Häder, D.P. 2000. Photoprotective compounds in cyanobacteria, phytoplankton and macroalgae—a database. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 58:115–22.
- Grzymiski, J., Johnsen, G. & Sakshaug, E. 1997. The significance of intracellular self-shading on the biooptical properties of brown, red, and green macroalgae. *Journal Appl. Phycol.* 33:408–14.
- Guallar, E., Aro, A., Jiménez, F.J., Martín-Moreno, J.M., Salminen, I., van't Veer, P., Kardinaal, A.F.M. et al. 1999. Omega-3 fatty acids in adipose tissue and risk of myocardial infarction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19:1111–8.
- Guan, X.Y., Zhang, W.J., Zhang, X.W., Li, Y.X., Wang, J.F., Lin, H.Z., Tang, X.X. et al. 2009. A potent anti-oxidant property: fluorescent recombinant α -phycocyanin of *Spirulina*. *J. Appl. Microbiol.* 106:1093–100.
- Güenaga, L. 2011. Influence of solar radiation and ammonium on the accumulation of antioxidant substances in seaweeds grown in a biofiltration system. Doctoral Thesis, Las Palmas G.C. University, 283 pp., 283 pp.
- Guihéneuf, F., Fouqueray, M., Mimouni, V., Ulmann, L., Jacquette, B. & Tremblin, G. 2010. Effect of UV stress on the fatty acid and lipid class composition in two marine microalgae *Pavlova lutheri* (Pavlovophyceae) and *Odontella aurita* (Bacillariophyceae). *J. Appl. Phycol.* 22:629–38.
- Guihéneuf, F., Mimouni, V., Ulmann, L. & Tremblin, G. 2009. Combined effects of irradiance level and carbon source on fatty acid and lipid class composition in the microalga *Pavlova lutheri* commonly used in mariculture. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 369:136–43.
- Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2016. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway.
- Gupta, S. & Abu-Ghannam, N. 2011. Recent developments in the application of seaweeds or seaweed extracts as a means for enhancing the safety and quality attributes of foods. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 12:600–9.
- Guschina, I.A. & Harwood, J.L. 2006. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Prog. Lipid Res.* 45:160–86.
- Häder, D.P., Kumar, H.D., Smith, R.C. & Worrest, R.C. 2007. Effects of solar UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change. *Photochem. Photobiol. Sci.* 6:267–85.
- Häder, D.P., Lebert, M. & Helbling, E.W. 2001. Effects of solar radiation on the Patagonian macroalga *Enteromorpha linza* (L.) J. Agardh—Chlorophyceae. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 62:43–54.
- Häder, D.P., Lebert, M., Sinha, R.P., Barbieri, E.S. & Helbling, E.W. 2002. Role of protective and repair mechanisms in the inhibition of photosynthesis in marine macroalgae. *Photochem. Photobiol. Sci.* 1:809–14.

- Hafting, J.T., Critchley, A.T., Cornish, M.L., Hubley, S.A. & Archibald, A.F. 2012. On-land cultivation of functional seaweed products for human usage. *J. Appl. Phycol.* 24:385–92.
- Haines, K.C. & Wheeler, P.A. 1978. Ammonium and nitrate uptake by the marine macrophytes *Hypnea musviformis* (rhodophyta) and *Macrocystis pyrifera* (phaeophyta) 1, 2. *J. Phycol.* 14:319–24.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. 2007. Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death. *Free radicals Biol. Med.* 4:187–267.
- Hanelt, D. & Roleda, M.Y. 2009. UVB radiation may ameliorate photoinhibition in specific shallow-water tropical marine macrophytes. *Aquat. Bot.* 91:6–12.
- Hanelt, D., Hawes, I. & Rae, R. 2006. Reduction of UV-B radiation causes an enhancement of photoinhibition in high light stressed aquatic plants from New Zealand lakes. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 84:89–102.
- Hanson, K.M. & Simon, J.D. 1998. Epidermal trans-urocanic acid and the UV-A-induced photoaging of the skin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:10576–8.
- Harel, M., Weiss, G., Lieman-Hurwitz, J., Gun, J., Lev, O., Lebendiker, M., Temper, V. et al. 2013. Interactions between *Scenedesmus* and *Microcystis* may be used to clarify the role of secondary metabolites. *Environ. Microbiol. Rep.* 5:97–104.
- Harlin, M.M. 1978. Nitrate uptake by *Enteromorpha* spp.(Chlorophyceae): applications to aquaculture systems. *Aquaculture.* 15:373–6.
- Harnedy, P.A. & FitzGerald, R.J. 2011. Bioactive Proteins, Peptides, and Amino Acids from Macroalgae 1. *J. Phycol.* 47:218–32.
- Harris, W.S., Lu, G., Rambjør, G.S., Wålen, A.I., Ontko, J.A., Cheng, Q. & Windsor, S.L. 1997. Influence of n-3 fatty acid supplementation on the endogenous activities of plasma lipases. *Am. J. Clin. Nutr.* 66:254–60.
- Hartmann, A., Gostner, J., Fuchs, J.E., Chaita, E., Aligiannis, N., Skaltsounis, L. & Ganzera, M. 2015. Inhibition of collagenase by mycosporine-like amino acids from marine sources. *Planta Med.* 81:813–20.
- Hawk, J.L.M., Black, A.K., Jaenicke, K.F., Barr, R.M., Soter, N.A., Mallett, A.I., Gilchrist, B.A. et al. 1983. Increased concentrations of arachidonic acid, prostaglandins E2, D2, and 6-oxo-F1 α , and histamine in human skin following UVA irradiation. *J. Invest. Dermatol.* 80:496–9.
- Heinrich, U., Tronnier, H., Kockott, D., Kuckuk, R. & Heise, H.M. 2004. Comparison of sun protection factors determined by an *in vivo* and different *in vitro* methodologies: a study with 58 different commercially available sunscreen products. *Int. J. Cosmet. Sci.* 26:79–89.
- Helbling, E.W. 2003. UV effects in aquatic organisms and ecosystems. Royal Society of Chemistry.
- Hemlata, G.P. & Fareha, B. 2011. Studies on *Anabaena* sp. nccu-9 with special reference to phycocyanin. *J Algal Biomass Util.* 2:30–51.
- Hemmi, A. & Jormalainen, V. 2002. Nutrient enhancement increases performance of a marine herbivore via quality of its food alga. *Ecology.* 83:1052–64.
- Heraud, P., Roberts, S., Shelly, K. & Beardall, J. 2005. Interactions between uv-b exposure and phosphorus nutrition. II. Effects on rates of damage and repair. *J. Phycol.* 41:1212–8.
- Hernández, I., Corzo, A., Gordillo, F.J., Robles, M.D., Saez, E., Fernández, J.A. & Niell, F.X. 1993. Seasonal cycle of the gametophytic form of *Porphyra umbilicalis*: nitrogen and carbon. *Mar. Ecol. Ser.* 99:301.
- Hernández, I., Fernández-Engo, M.A., Pérez-Lloréns, J.L. & Vergara, J.J. 2005. Integrated outdoor culture of two estuarine macroalgae as biofilters for dissolved nutrients from *Sparus aurata* waste waters. *J. Appl. Phycol.* 17:557–67.

- Hernandez, I., Martinez-Aragon, J.F., Tovar, A., Terez-Llorens, J.L. & Vergara, J.J. 2002. Biofiltering efficiency in removal of dissolved nutrients by the three species of estuarine macroalgae with sea bass (*Dicentrarchus labrax*) waste waters 2. Ammonium. *J. Appl. Phycol.* 14:375–84.
- Hernández, I., Pérez-Pastor, A., Vergara, J.J., Martínez-Aragón, J.F., Fernández-Engo, M.Á. & Pérez-Lloréns, J.L. 2006. Studies on the biofiltration capacity of *Gracilariopsis longissima*: From microscale to macroscale. *Aquaculture*. 252:43–53.
- Hernandez-Ledesma, B. & Herrero, M. 2013. Bioactive compounds from marine foods: plant and animal sources. John Wiley & Sons.
- Hertweck, C., Luzhetskyy, A., Rebets, Y. & Bechthold, A. 2007. Type II polyketide synthases: gaining a deeper insight into enzymatic teamwork. *Nat. Prod. Rep.* 24:162–90.
- Hessen, D.A.G., DE LANGE, H. & van Donk, E. 1997. UV-induced changes in phytoplankton cells and its effects on grazers. *Freshw. Biol.* 38:513–24.
- Hidalgo, M.E., Fernández, E., Quilhot, W. & Lissi, E. 1994. Antioxidant activity of depsides and depsidones. *Phytochemistry*. 37:1585–7.
- Hikima, J., Ando, M., Hamaguchi, H., Sakai, M., Maita, M., Yazawa, K., Takeyama, H. et al. 2017. On-site Direct Detection of Astaxanthin from Salmon Fillet Using Raman Spectroscopy. *Mar. Biotechnol.* 19:157–63.
- Hoek, C., Mann, D. & Jahns, H.M. 1995. Algae: an introduction to phycology. Cambridge university press.
- Hollós, F. 2002. Effects of ultraviolet radiation on plant cells. *Micron*. 33:179–97.
- Holzinger, A. & Lütz, C. 2006. Algae and UV irradiation: effects on ultrastructure and related metabolic functions. *Micron*. 37:190–207.
- Holzinger, A., Lütz, C., Karsten, U. & Wiencke, C. 2004. The Effect of Ultraviolet Radiation on Ultrastructure and Photosynthesis in the Red Macroalgae *Palmaria palmata* and *Odonthalia dentata* from Arctic Waters. *Plant Biol.* 6:568–77.
- Hsu, K.H. & Chauhan, A. 2016. Photoprotection and extended drug delivery by UV blocking contact lenses. *Optom. Vis. Sci.* 93:395–403.
- Hu, C.C., Lin, J.T., Lu, F.J., Chou, F.P. & Yang, D.J. 2008. Determination of carotenoids in *Dunaliella salina* cultivated in Taiwan and antioxidant capacity of the algal carotenoid extract. *Food Chem.* 109:439–46.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M. & Darzins, A. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: Perspectives and advances. *Plant J.* 54:621–39.
- Huang, D., Boxin, O.U. & Prior, R.L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* 53:1841–56.
- Hughes, E. & Benemann, J.R. 1997. Biological fossil CO₂ mitigation. *Energy Convers. Manag.* 38:S467–73.
- Huovinen, P., Matos, J., Pinto, I.S. & Figueroa, F.L. 2006. The role of ammonium in photoprotection against high irradiance in the red alga *Grateloupia lanceola*. *Aquat. Bot.* 84:308–16.
- Hwang, H.J., Kim, I.H. & Nam, T.J. 2008. Effect of a glycoprotein from *Hizikia fusiformis* on acetaminophen-induced liver injury. *Food Chem. Toxicol.* 46:3475–81.
- Ibañez, E. & Cifuentes, A. 2013. Benefits of using algae as natural sources of functional ingredients. *J. Sci. Food Agric.* 93:703–9.
- Ibrahim, M.H. & Jaafar, H.Z.E. 2011. The relationship of nitrogen and C/N ratio with secondary metabolites levels and antioxidant activities in three varieties of malaysian kacip fatimah (*Labisia pumila* Blume). *Molecules*. 16:5514–26.

- Ilvessalo, H. & Tuomi, J. 1989. Nutrient availability and accumulation of phenolic compounds in the brown alga *Fucus vesiculosus*. *Mar. Biol.* 101:115–9.
- Imbs, A.B., Vologodskaya, A. V., Nevshupova, N. V., Khotimchenko, S. V & Titlyanov, E.A. 2001. Response of prostaglandin content in the red alga *Gracilaria verrucosa* to season and solar irradiance. *Phytochemistry*. 58:1067–72.
- Irwin, C., Barnes, A., Veres, D. & Kaidbey, K. 1993. An ultraviolet radiation action spectrum for immediate pigment darkening. *Photochem. Photobiol.* 57:504–7.
- Isnansetyo, A., Lutfia, F.N.L., Nursid, M. & Susidarti, R.A. 2017. Cytotoxicity of Fucoidan from Three Tropical Brown Algae Against Breast and Colon Cancer Cell Lines. *Pharmacogn. J.* 9.
- Izquierdo, M.S., Watanabe, T., Takeuchi, T., Arakawa, T. & Kitajima, C. 1990. Optimum EFA levels in *Artemia* to meet the EFA requirements of red sea bream (*Pagrus major*). *Curr. Status Fish Nutr. Aquac.* 221–32.
- Jahan, A., Ahmad, I.Z., Fatima, N., Ansari, V.A. & Akhtar, J. 2017. Algal bioactive compounds in the cosmeceutical industry: a review. *Phycologia*. 56:410–22.
- Jahnke, L.S. 1999. Massive carotenoid accumulation in *Dunaliella bardawil* induced by ultraviolet-A radiation. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 48:68–74.
- James, G.T. 1978. Inactivation of the protease inhibitor phenylmethylsulfonyl fluoride in buffers. *Anal. Biochem.* 86:574–9.
- Jayaprakasha, G.K., Singh, R.P. & Sakariah, K.K. 2001. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models *in vitro*. *Food Chem.* 73:285–90.
- Jeffrey, S.W. & Vesk, M. 1997. Introduction to marine phytoplankton and their pigment signatures. na.
- Jerez, C.G., Malapascua, J.R., Sergejevojová, M., Masoj'idek, J. & Figueroa, F.L. 2016. *Chlorella fusca* (Chlorophyta) grown in thin-layer cascades: Estimation of biomass productivity by *in vivo* chlorophyll a fluorescence monitoring. *Algal Res.* 17:21–30.
- Jiang, R., Ingle, K.N. & Golberg, A. 2016. Macroalgae (seaweed) for liquid transportation biofuel production: what is next? *Algal Res.* 14:48–57.
- Jiménez, J., González, N., Fernández, M., Elvira, C., López, A. & San Román, J. 2008. Estudio de la biocompatibilidad *in vitro* de polímeros metacrílicos derivados de pirrolidona-ina.
- Jin, E., Polle, J.E.W., Lee, H.K., Hyun, S.M. & Chang, M. 2003. Xanthophylls in microalgae: from biosynthesis to biotechnological mass production and application. *J. Microbiol. Biotechnol.* 13:165–74.
- Jo, C., Khan, F.F., Khan, M.I. & Iqbal, J. 2017. Marine bioactive peptides: Types, structures, and physiological functions. *Food Rev. Int.* 33:44–61.
- John, R.P. & Anisha, G.S. 2012. Macroalgae and their potential for biofuel. *Plant Sci. Rev.* 2011. 151–62.
- John, R.P., Anisha, G.S., Nampoothiri, K.M. & Pandey, A. 2011. Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. *Bioresour. Technol.* 102:186–93.
- Johnsen, G. & Sakshaug, E. 2007. Biooptical characteristics of PSII and PSI in 33 species (13 pigment groups) of marine phytoplankton, and the relevance for pulse-amplitude-modulated and fast-repetition-rate fluorometry1. *J. Phycol.* 43:1236–51.
- Johnson, R.B., Kim, J.K., Armbruster, L.C. & Yarish, C. 2014. Nitrogen allocation of *Gracilaria tikvahiae* grown in urbanized estuaries of Long Island Sound and New York City, USA: a preliminary evaluation of ocean farmed *Gracilaria* for alternative fish feeds. *Algae*. 29:227.
- Jones, A.B., Denisson, W.C. & Stewart, G.R. 1996. Macroalgal responses to nitrogen source and availability: amino acid metabolic profiling as a bioindicator using *Gracilaria edulis* (Rhodophyta). *J. Phycol.* 32:757–66.

- Jones, L.W. & Kok, B. 1966. Photoinhibition of chloroplast reactions. I. Kinetics and action spectra. *Plant Physiol.* 41:1037–43.
- Jormalainen, V. & Honkanen, T. 2004. Variation in natural selection for growth and phlorotannins in the brown alga *Fucus vesiculosus*. *J. Evol. Biol.* 17:807–20.
- Jorquera, O., Kiperstok, A., Sales, E.A., Embirucu, M. & Ghirardi, M.L. 2010. Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors. *Bioresour. Technol.* 101:1406–13.
- Jung, K.A., Lim, S.R., Kim, Y. & Park, J.M. 2013. Potentials of macroalgae as feedstocks for biorefinery. *Bioresour. Technol.* 135:182–90.
- Kadam Vaishali S, Chintale Ashwini G, D.K.P. 2013. Cosmeceuticals an emerging concept: A comprehensive review. *Int. J. Res. Pharm. Chem.* 3:308–16.
- Kadam, S.U., Tiwari, B.K. & O'Donnell, C.P. 2013. Application of novel extraction technologies for bioactives from marine algae. *J. Agric. Food Chem.* 61:4667–75.
- Kadam, S.U., Tiwari, B.K., Smyth, T.J. & O'Donnell, C.P. 2015. Optimization of ultrasound assisted extraction of bioactive components from brown seaweed *Ascophyllum nodosum* using response surface methodology. *Ultrason. Sonochem.* 23:308–16.
- Kaidbey, K.H. & Kligman, A.M. 1979. The acute effects of long-wave ultraviolet radiation on human skin. *J. Invest. Dermatol.* 72:253–6.
- Kaiser, D., Sieratowicz, A., Zielke, H., Oetken, M., Hollert, H. & Oehlmann, J. 2012. Ecotoxicological effect characterisation of widely used organic UV filters. *Environ. Pollut.* 163:84–90.
- Kamenarska, Z.G., Dimitrova-Konaklieva, S.D., Stefanov, L.K. & Popov, S.S. 2003. A comparative study on the sterol composition of some brown algae from the Black Sea. *J. Serbian Chem. Soc.* 68:269–75.
- Kang, Y., Wang, Z.J., Xie, D., Sun, X., Yang, W., Zhao, X. & Xu, N. 2017. Characterization and Potential Antitumor Activity of Polysaccharide from *Gracilariopsis lemaneiformis*. *Mar. Drugs*. 15:100.
- Kang, Y.H., Kim, S., Lee, J.B., Chung, I.K. & Park, S.R. 2014. Nitrogen biofiltration capacities and photosynthetic activity of *Pyropia yezoensis* Ueda (Bangiales, Rhodophyta): groundwork to validate its potential in integrated multi-trophic aquaculture (IMTA). *J. Appl. Phycol.* 26:947–55.
- Kang, Y.H., Shin, J.A., Kim, M.S. & Chung, I.K. 2008. A preliminary study of the bioremediation potential of *Codium fragile* applied to seaweed integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) during the summer. *J. Appl. Phycol.* 20:183–90.
- Kannaujiya, V.K. & Sinha, R.P. 2017. Impacts of diurnal variation of ultraviolet-B and photosynthetically active radiation on phycobiliproteins of the hot-spring cyanobacterium *Nostoc* sp. strain HKAR-2. *Protoplasma*. 254:423–33.
- Kannaujiya, V.K., Richa, V.K. & Sinha, R.P. 2014. Peroxide scavenging potential of ultraviolet-B-absorbing mycosporine-like amino acids isolated from a marine red alga *Bryocladia* sp. *Front. Environ. Sci.* 2:26.
- Kaplan, A. & Glucose, K.A. 1984. Clin Chem The CV Mosby Co. *St Louis. Toronto. Princet.* 436.
- Kar, M. & Mishra, D. 1976. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiol.* 57:315–9.
- Karsten, U., Sawall, T., Hanelt, D., Bischof, K., Figueroa, F.L., Flores-Moya, A. & Wiencke, C. 1998. An inventory of UV-absorbing mycosporine-like amino acids in macroalgae from polar to warm-temperate regions. *Bot. Mar.* 41:443–53.
- Karsten, U., Wulff, A., Roleda, M.Y., Müller, R., Steinhoff, F.S., Fredersdorf, J. & Wiencke, C. 2009. Physiological responses of polar benthic algae to ultraviolet radiation. *Bot. Mar.* 52:639–54.

- Katsui, N., Suzuki, Y., Kitamura, S. & Irie, T. 1967. 5, 6-Dibromoprotocatechualdehyde and 2, 3-dibromo-4, 5-dihydroxybenzyl methyl ether: New dibromophenols from *Rhodomela larix*. *Tetrahedron*. 23:1185–8.
- Kawakami, C.M. & Gaspar, L.R. 2015. Mangiferin and naringenin affect the photostability and phototoxicity of sunscreens containing avobenzone. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 151:239–47.
- Kazłowska, K., Hsu, T., Hou, C.C., Yang, W.C. & Tsai, G.J. 2010. Anti-inflammatory properties of phenolic compounds and crude extract from *Porphyra dentata*. *J. Ethnopharmacol.* 128:123–30.
- Kelloff, G.J., Crowell, J.A., Steele, V.E., Lubet, R.A., Malone, W.A., Boone, C.W., Kopelovich, L. et al. 2000. Progress in cancer chemoprevention: development of diet-derived chemopreventive agents. *J. Nutr.* 130:467S–471S.
- Khalifa, K.S., Hamouda, R.A., Hanafy, D. & Hamza, A. 2016. In vitro antitumor activity of silver nanoparticles biosynthesized by marine algae. *Dig. J. Nanomater. Biostructures.* 11:213–21.
- Khoddami, A., Wilkes, M.A. & Roberts, T.H. 2013. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules.* 18:2328–75.
- Khotimchenko, S. V & Yakovleva, I.M. 2005. Lipid composition of the red alga *Tichocarpus crinitus* exposed to different levels of photon irradiance. *Phytochemistry.* 66:73–9.
- Kim, D.O., Lee, K.W., Lee, H.J. & Lee, C.Y. 2002. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *J. Agric. Food Chem.* 50:3713–7.
- Kim, H.K., Cheon, B.S., Kim, Y.H., Kim, S.Y. & Kim, H.P. 1999. Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure–activity relationships. *Biochem. Pharmacol.* 58:759–65.
- Kim, J.K., Yarish, C. & Pereira, R. 2016. Tolerances to hypo-osmotic and temperature stresses in native and invasive species of *Gracilaria* (Rhodophyta). *Phycologia.* 55:257–64.
- Kim, K.Y., Nam, K.A., Kurihara, H. & Kim, S.M. 2008. Potent α -glucosidase inhibitors purified from the red alga *Grateloupia elliptica*. *Phytochemistry.* 69:2820–5.
- Kim, K.Y., Nguyen, T.H., Kurihara, H. & Kim, S.M. 2010. α Glucosidase Inhibitory Activity of Bromophenol Purified from the Red Alga *Polyopes lancifolia*. *J. Food Sci.* 75:H145–50.
- Kim, S., You, D.H., Han, T. & Choi, E.M. 2014. Modulation of viability and apoptosis of UVB-exposed human keratinocyte HaCaT cells by aqueous methanol extract of laver (*Porphyra yezoensis*). *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 141:301–7.
- Kim, S.K. & Chojnacka, K. 2015. Marine Algae Extracts: Processes, Products, and Applications, 2 Volume Set. John Wiley & Sons. 784 pp.
- Kim, S.K., Ravichandran, Y.D., Khan, S.B. & Kim, Y.T. 2008. Prospective of the cosmeceuticals derived from marine organisms. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 13:511–23.
- Kladi, M., Vagias, C. & Roussis, V. 2004. Volatile halogenated metabolites from marine red algae. *Phytochem. Rev.* 3:337–66.
- Klughhammer, C. & Schreiber, U. 2008. Complementary PS II quantum yields calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and the Saturation Pulse method. *PAM Appl. notes.* 27–35.
- Klyachko-Gurvich, G.L., Tsoglin, L.N., Doucha, J., Kopetskii, J. & Semenenko, V.E. 1999. Desaturation of fatty acids as an adaptive response to shifts in light intensity. *Physiol. Plant.* 107:240–9.
- Kockler, J., Oelgemöller, M., Robertson, S. & Glass, B.D. 2012. Photostability of sunscreens. *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* 13:91–110.
- Korać, R. & Khambholja, K. 2011. Potential of herbs in skin protection from ultraviolet radiation. *Pharmacogn. Rev.* 5:164.

- Korbee, N., Abdala Díaz, R.T., Figueroa, F.L. & Helbling, E.W. 2004a. Ammonium and UV radiation stimulate the accumulation of mycosporine-like amino acids in *Porphyra columbina* (Rhodophyta) from Patagonia, Argentina. *J. Phycol.* 40:248–59.
- Korbee, N., Abdala Díaz, R.T., Figueroa, F.L., Helbling, E.W., Peinado, N.K., Abdala Díaz, R.T., Figueroa, F.L. et al. 2004b. Ammonium and UV radiation stimulate the accumulation of mycosporine-like amino acids in *Porphyra columbina* (Rhodophyta) from Patagonia, Argentina. *J. Phycol.* 40:248–59.
- Korbee, N., Figueroa, F.L. & Aguilera, J. 2005. Effect of light quality on the accumulation of photosynthetic pigments, proteins and mycosporine-like amino acids in the red alga *Porphyra leucosticta* (Bangiales, Rhodophyta). *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 80:71–8.
- Korbee, N., Figueroa, F.L. & Aguilera, J. 2006. Accumulation of mycosporine-like amino acids (MAAs): biosynthesis, photocontrol and ecophysiological functions. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 79:119–32.
- Korbee, N., Huovinen, P., Figueroa, F.L., Aguilera, J. & Karsten, U. 2005. Availability of ammonium influences photosynthesis and the accumulation of mycosporine-like amino acids in two *Porphyra* species (Bangiales, Rhodophyta). *Mar. Biol.* 146:645–54.
- Korbee, N., Mata, M.T. & Figueroa, F.L. 2010. Photoprotection mechanisms against ultraviolet radiation in *Heterocapsa* sp. (Dinophyceae) are influenced by nitrogen availability: Mycosporine-like amino acids vs. xanthophyll cycle. *Limnol. Oceanogr.* 55:899–908.
- Kostyuk, V., Potapovich, A., Albuhaydar, A.R., Mayer, W., De Luca, C. & Korkina, L. 2017. Natural substances for prevention of skin photoaging: screening systems in the development of sunscreen and rejuvenation cosmetics. *Rejuvenation Res.*
- Kovač, D.J., Simeunović, J.B., Babić, O.B., Mišan, A.Č. & Milovanović, I.L. 2013. Algae in food and feed. *Food Feed Res.* 40:21–31.
- Kräbs, G., Bischof, K., Hanelt, D., Karsten, U. & Wiencke, C. 2002. Wavelength-dependent induction of UV-absorbing mycosporine-like amino acids in the red alga *Chondrus crispus* under natural solar radiation. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 268:69–82.
- Kräbs, G., Watanabe, M. & Wlencke, C. 2004. A monochromatic action spectrum for the photoinduction of the UV-absorbing mycosporine-like amino acid shinorine in the red alga *Chondrus crispus*. *Photochem. Photobiol.* 79:515–20.
- Krause, G.H. & Weis, E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annu. Rev. Plant Biol.* 42:313–49.
- Kris-Etherton, P.M., Harris, W.S. & Appel, L.J. 2003. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23:e20–30.
- Kromkamp, J.C., Beardall, J., Sukenik, A., Kopecký, J., Masojídek, J., van Bergeijk, S., Gabai, S. et al. 2009. Short-term variations in photosynthetic parameters of *Nannochloropsis* cultures grown in two types of outdoor mass cultivation systems. *Aquat. Microb. Ecol.* 56:309–22.
- Kromkamp, J.C., Dijkman, N.A., Peene, J., Simis, S.G.H. & Gons, H.J. 2008. Estimating phytoplankton primary production in Lake IJsselmeer (The Netherlands) using variable fluorescence (PAM-FRRF) and C-uptake techniques. *Eur. J. Phycol.* 43:327–44.
- Kuda, T., Tsunekawa, M., Goto, H. & Araki, Y. 2005. Antioxidant properties of four edible algae harvested in the Noto Peninsula, Japan. *Journal Food Compos. Anal.* 18:625–33.
- Kulisic, T., Radonic, a., Katalinic, V. & Milos, M. 2004. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chem.* 85:633–40.
- Kumar, J., Parihar, P., Singh, R., Singh, V.P. & Prasad, S.M. 2016. UV-B induces biomass production and nonenzymatic antioxidant compounds in three cyanobacteria. *J. Appl. Phycol.* 28:131–40.
- Kumar, M., Kumari, P., Trivedi, N., Shukla, M.K., Gupta, V., Reddy, C.R.K. & Jha, B. 2011. Minerals, PUFAs and antioxidant properties of some tropical seaweeds from Saurashtra coast of India. *J. Appl.*

- Phycol.* 23:797–810.
- Kumar, S.S., Shankar, B. & Sainis, K.B. 2004. Effect of chlorophyllin against oxidative stress in splenic lymphocytes *in vitro* and *in vivo*. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-General Subj.* 1672:100–11.
- Kursar, T. A., van der Meer, J. & Alberte, R.S. 1983. Light-harvesting system of the red alga *Gracilaria tikvahiae*: II. Phycobilisome characteristics of pigment mutants. *Plant Physiol.* 73:361–9.
- Kusano, M., Tohge, T., Fukushima, A., Kobayashi, M., Hayashi, N., Otsuki, H., Kondou, Y. et al. 2011. Metabolomics reveals comprehensive reprogramming involving two independent metabolic responses of *Arabidopsis* to UV-B light. *Plant J.* 67:354–69.
- La Barre, S., Roullier, C., Boustie, J. & Kornprobst, J.-M. 2014. Mycosporine-Like Amino Acids (MAAs) in Biological Photosystems. In *Outstanding Marine Molecules*. John Wiley & Sons, pp. 333–60.
- Lamers, P.P., Janssen, M., De Vos, R.C.H., Bino, R.J. & Wijffels, R.H. 2012. Carotenoid and fatty acid metabolism in nitrogen-starved *Dunaliella salina*, a unicellular green microalga. *J. Biotechnol.* 162:21–7.
- Lanfer-Marquez, U.M., Barros, R.M.C. & Sinnecker, P. 2005. Antioxidant activity of chlorophylls and their derivatives. *Food Res. Int.* 38:885–91.
- Lao, K. & Glazer, A.N. 1996. Ultraviolet-B photodestruction of a light-harvesting complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:5258–63.
- Lapointe, B.E. & Duke, C.S. 1984. Biochemical strategies for growth of *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyta) in relation to light intensity and nitrogen availability. *J. Phycol.* 20:488–95.
- Lapointe, B.E. 1981. The effects of light and nitrogen on growth, pigment content, and biochemical composition of *Gracilaria foliifera* v. *angustissima* (Gigartinales, Rhodophyta). *J. Phycol.* 17:90–5.
- Laurens, L.M.L., Chen-Glasser, M. & McMillan, J.D. 2017. A perspective on renewable bioenergy from photosynthetic algae as feedstock for biofuels and bioproducts. *Algal Res.* 24:261–4.
- Lawrence, K.P., Long, P.F. & Young, A.R. 2017. Mycosporine-like Amino Acids for Skin Photoprotection. *Curr. Med. Chem.*
- Lawrenz, E., Silsbe, G., Capuzzo, E., Ylöstalo, P., Forster, R.M., Simis, S.G.H., Prášil, O. et al. 2013. Predicting the electron requirement for carbon fixation in seas and oceans. *PLoS One.* 8:e58137.
- Laws, E.A. 1991. Photosynthetic quotients, new production and net community production in the open ocean. *Deep Sea Res. Part A. Oceanogr. Res. Pap.* 38:143–67.
- Le Pogam, P., Legouin, B., Le Lamer, A.C., Boustie, J. & Rondeau, D. 2015. Analysis of the cyanolichen *Lichina pygmaea* metabolites using in situ DART-MS: from detection to thermochemistry of mycosporine serinol. *J. Mass Spectrom.* 50:454–62.
- Leaf, A. & Kang, J.X. 1996. Prevention of cardiac sudden death by n-3 fatty acids: a review of the evidence. *J. Intern. Med.* 240:5–12.
- Leckner, B. 1978. The spectral distribution of solar radiation at the earth's surface—elements of a model. *Sol. energy.* 20:143–50.
- Lee, H.J., Dang, H.T., Kang, G.J., Yang, E.J., Park, S.S., Yoon, W.J., Jung, J.H. et al. 2009. Two enone fatty acids isolated from *Gracilaria verrucosa* suppress the production of inflammatory mediators by down-regulating NF- κ B and STAT1 activity in lipopolysaccharide-stimulated Raw 264.7 cells. *Arch. Pharm. Res.* 32:453–62.
- Lee, S., Lee, Y.S., Jung, S.H., Kang, S.S. & Shin, K.H. 2003. Anti-oxidant activities of fucosterol from the marine algae *Pelvetia siliquosa*. *Arch. Pharm. Res.* 26:719–22.
- Lee, W.K., Lim, Y.Y., Leow, A.T.C., Namasivayam, P., Abdullah, J.O. & Ho, C.L. 2017. Biosynthesis of agar in red seaweeds: A review. *Carbohydr. Polym.*

- Lee, Y.S., Shin, K.H., Kim, B.K. & Lee, S. 2004. Anti-diabetic activities of fucosterol from *Pelvetia siliquosa*. *Arch. Pharm. Res.* 27:1120–2.
- Lehmann, B. 1997. HaCaT cell line as a model system for vitamin D3 metabolism in human skin. *J. Invest. Dermatol.* 108:78–82.
- Lemahieu, C., Bruneel, C., Dejonghe, C., Buyse, J. & Foubert, I. 2016. The cell wall of autotrophic microalgae influences the enrichment of long chain omega-3 fatty acids in the egg. *Algal Res.* 16:209–15.
- Leonard, H.P. 2006. Nutracéuticos: componente emergente para el beneficio de la salud. *ICIDCA. Sobre los Deriv. la Caña Azúcar.* 40:20–8.
- Lesser, M.P. 1996. Elevated temperatures and ultraviolet radiation cause oxidative stress and inhibit photosynthesis in symbiotic dinoflagellates. *Limnol. Oceanogr.* 41:271–83.
- Lesser, M.P. 2006. Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and Physiological Ecology Early History of Oxygen. *Annu. Rev. Physiol.* 68:253–78.
- Levy, I., Maxim, C. & Friedlander, M. 1992. Fatty acid distribution among some red algal macrophytes. *J. Phycol.* 28:299–304.
- Lewandowski, I., Scurlock, J.M.O., Lindvall, E. & Christou, M. 2003. The development and current status of perennial rhizomatous grasses as energy crops in the US and Europe. *Biomass and Bioenergy.* 25:335–61.
- Leyton, A., Pezoa-Conte, R., Barriga, A., Buschmann, A.H., Mäki-Arvela, P., Mikkola, J.P. & Lienqueo, M.E. 2016. Identification and efficient extraction method of phlorotannins from the brown seaweed *Macrocystis pyrifera* using an orthogonal experimental design. *Algal Res.* 16:201–8.
- Li, B., Zhang, X., Gao, M. & Chu, X. 2005. Effects of CD59 on antitumoral activities of phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Biomed. Pharmacother.* 59:551–60.
- Li, K., Li, X.M., Gloer, J.B. & Wang, B.G. 2012. New nitrogen-containing bromophenols from the marine red alga *Rhodomela confervoides* and their radical scavenging activity. *Food Chem.* 135:868–72.
- Liang, Y., Beardall, J., Heraud, P. & Sciences, B. 2006. Effect of UV radiation on growth, chlorophyll fluorescence and fatty acid composition of *Phaeodactylum tricornutum* and *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae). *Phycologia.* 45:605–15.
- Liazi, A., Palma, M., Brigue, J. & Barroso, C.G. 2007. Investigation on phenolic compounds stability during microwave-assisted extraction. *J. Chromatogr. A.* 1140:29–34.
- Lim, H.W., Arellano-Mendoza, M.I. & Stengel, F. 2017. Current challenges in photoprotection. *J. Am. Acad. Dermatol.* 76:S91–9.
- Lindqvist, P.G., Epstein, E., Nielsen, K., Landin-Olsson, M., Ingvar, C. & Olsson, H. 2016. Avoidance of sun exposure as a risk factor for major causes of death: a competing risk analysis of the melanoma in Southern Sweden cohort. *J. Intern. Med.* 280:375–87.
- Lindroth, R.L. 2010. Impacts of elevated atmospheric CO₂ and O₃ on forests: Phytochemistry, trophic interactions, and ecosystem dynamics. *J. Chem. Ecol.* 36:2–21.
- Liotenberg, S., Campbell, D., Rippka, R., Houmard, J. & de Marsac, N.T. 1996. Effect of the nitrogen source on phycobiliprotein synthesis and cell reserves in a chromatically adapting filamentous cyanobacterium. *Microbiology.* 142 (Pt 3:611–22.
- Litchman, E., Neale, P.J. & Banaszak, A.T. 2002. Increased sensitivity to ultraviolet radiation in nitrogen-limited dinoflagellates: Photoprotection and repair. *Limnol. Oceanogr.* 47:86–94.
- Liu, D., Amy, P., Sun, J., Dongyan, L., Pickering, A. & Jun, S. 2004. Preliminary study on the responses of three marine algae, *Ulva pertusa* (Chlorophyta), *Gelidium amansii* (Rhodophyta) and *Sargassum enerve* (Phaeophyta), to nitrogen source and its availability. *J. Ocean Univ. China.* 3:75–9.

- Liu, H., Wang, F., Wang, Q., Dong, S. & Tian, X. 2016. A comparative study of the nutrient uptake and growth capacities of seaweeds *Caulerpa lentillifera* and *Gracilaria lichenoides*. *J. Appl. Phycol.* 28:3083–9.
- Liu, J., Willför, S. & Xu, C. 2015. A review of bioactive plant polysaccharides: Biological activities, functionalization, and biomedical applications. *Bioact. Carbohydrates Diet. Fibre.* 5:31–61.
- Liu, M., Hansen, P.E. & Lin, X. 2011. Bromophenols in marine algae and their bioactivities. *Mar. Drugs.* 9:1273–92.
- Liu, Q., Xu, S., Li, L., Pan, T., Shi, C., Liu, H., Cao, M. et al. 2017. *In vitro* and *in vivo* immunomodulatory activity of sulfated polysaccharide from *Porphyra haitanensis*. *Carbohydr. Polym.* 165:189–96.
- Liyana-Pathirana, C. & Shahidi, F. 2005. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chem.* 93:47–56.
- Loizou, S., Lekakis, I., Chrousos, G.P. & Moutsatsou, P. 2010. β -Sitosterol exhibits anti-inflammatory activity in human aortic endothelial cells. *Mol. Nutr. Food Res.* 54:551–8.
- Longstaff, B.J., Kildea, T., Runcie, J.W., Cheshire, A., Dennison, W.C., Hurd, C., Kana, T. et al. 2002. An in situ study of photosynthetic oxygen exchange and electron transport rate in the marine macroalga *Ulva lactuca* (Chlorophyta). *Photosynth. Res.* 74:281–93.
- López Figueroa, F., Aguilera Arjona, J., Coba Luque, F. de la & Korbee Peinado, N. 2009. Composición para protección solar a base de extractos de algas y líquenes.
- López, A., Rico, M., Rivero, A. & Suárez de Tangil, M. 2011. The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts. *Food Chem.* 125:1104–9.
- López, J.A. 2017. Removal of NAT by *Gracilaria vermiculophylla* cultivated with *Litopenaeus vannamei* in an integrated without water exchange system: Effect of photoperiod and the rate shrimp-macroalgae. *Submiss. Artic. platform-Latin Am. J. Aquat. Res.* 41.
- Lorenz, P., Berger, M., Bertrams, J., Wende, K., Wenzel, K., Lindequist, U., Meyer, U. et al. 2008. Natural wax constituents of a supercritical fluid CO₂ extract from quince (*Cydonia oblonga* Mill.) pomace. *Anal. Bioanal. Chem.* 391:633.
- Lourenço, S.O., Barbarino, E., De-Paula, J.C., Pereira, L.O.D.S. & Lanfer Marquez, U.M. 2002. Amino acid composition, protein content and calculation of nitrogen-to-protein conversion factors for 19 tropical seaweeds. *Phycol. Res.* 50:233–41.
- Luckner, M. 2013. Secondary metabolism in microorganisms, plants and animals. Springer Science & Business Media.
- Ma, M., Zhao, J., Wang, S., Li, S., Yang, Y., Shi, J., Fan, X. et al. 2006. Bromophenols Coupled with Methyl γ -Ureidobutyrate and Bromophenol Sulfates from the Red Alga *Rhodomela confervoides*. *J. Nat. Prod.* 69:206–10.
- Macchiavello, J. & Bulboa, C.R. 2017. Nutrient uptake efficiency of *Gracilaria chilensis* and *Ulva lactuca* in an IMTA system with the red abalone *Haliotis rufescens*. *Submiss. Artic. platform-Latin Am. J. Aquat. Res.* 42.
- Maceiras, R., Rodríguez, M., Cancela, A., Urréjola, S. & Sánchez, A. 2011. Macroalgae: Raw material for biodiesel production. *Appl. Energy.* 88:3318–23.
- Macler, B.A. & West, J.A. 1987. Life history and physiology of the red alga, *Gelidium coulteri*, in unialgal culture. *Aquaculture.* 61:281–93.
- Makino, A. & Osmond, B. 1991. effects of nitrogen nutrition on nitrogen partitioning between chloroplasts and mitochondria in pea and wheat. *Plant Physiol.* 96:355–62.
- Malanga, G., Calmanovici, G. & Puntarulo, S. 1997. Oxidative damage to chloroplasts from *Chlorella vulgaris* exposed to ultraviolet-B radiation. *Physiol. Plant.* 101:455–62.

- Mallick, N. & Mohn, F.H. 2000. Reactive oxygen species: response of algal cells. *J. Plant Physiol.* 157:183–93.
- Maoka, T. 2011. Carotenoids in marine animals. *Mar. Drugs.* 9:278–93.
- Marinho-Soriano, E., Azevedo, C.A.A., Trigueiro, T.G., Pereira, D.C., Carneiro, M.A.A. & Camara, M.R. 2011. Bioremediation of aquaculture wastewater using macroalgae and *Artemia*. *Int. Biodeterior. Biodegradation.* 65:253–7.
- Martindale, J.L. & Holbrook, N.J. 2002. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J. Cell. Physiol.* 192:1–15.
- Martinez, C., Delgado, M., Pozo, D., Leceta, J., Calvo, J.R., Ganea, D. & Gomariz, R.P. 1998. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide modulate endotoxin-induced IL-6 production by murine peritoneal macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 63:591–601.
- Martínez-Aragón, J.F., Hernández, I., Pérez-Lloréns, J.L., Vázquez, R. & Vergara, J.J. 2002. Biofiltering efficiency in removal of dissolved nutrients by three species of estuarine macroalgae cultivated with sea bass (*Dicentrarchus labrax*) waste waters 1. Phosphate. *J. Appl. Phycol.* 14:365–74.
- Maschek, J.A. & Baker, B.J. 2008. The chemistry of algal secondary metabolism. In *Algal Chemical Ecology*. Springer, pp. 1–24.
- Masojidek, J., Vonshak, A. & Torzillo, G. 2010. Chlorophyll fluorescence applications in microalgal mass cultures. In *Chlorophyll a Fluorescence in Aquatic Sciences: Methods and Applications*. Springer, pp. 277–92.
- Mata, L. & Santos, R. 2003. Cultivation of *Ulva rotundata* (Ulvales, Chlorophyta) in raceways, using semi-intensive fishpond effluents: yield and biofiltration. In *Proceedings of the 17th International Seaweed Symposium*. Oxford University Press, Cape Town. pp. 237–42.
- Mata, L., Schuenhoff, A. & Santos, R. 2010. A direct comparison of the performance of the seaweed biofilters, *Asparagopsis armata* and *Ulva rigida*. *J. Appl. Phycol.* 22:639–44.
- Mata, L., Silva, J., Schuenhoff, A. & Santos, R. 2007. Is the tetrasporophyte of *Asparagopsis armata* (Bonnemaisoniales) limited by inorganic carbon in integrated aquaculture? 1. *J. Phycol.* 43:1252–8.
- Matanjun, P., Mohamed, S., Mustapha, N.M., Muhammad, K. & Ming, C.H. 2008. Antioxidant activities and phenolics content of eight species of seaweeds from north Borneo. *J. Appl. Phycol.* 20:367–73.
- Mazumder, S., Ghosal, P.K., Pujol, C.A., Carlucci, M.J., Damonte, E.B. & Ray, B. 2002. Isolation, chemical investigation and antiviral activity of polysaccharides from *Gracilaria corticata* (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Int. J. Biol. Macromol.* 31:87–95.
- McAllister, B.S., Leebundberg, L.M.F., Javors, M.A. & Olson, M.S. 1993. Bradykinin receptors and signal transduction pathways in human fibroblasts: integral role for extracellular calcium. *Arch. Biochem. Biophys.* 304:294–301.
- McCarty, M.F. 2001. The chlorophyll metabolite phytanic acid is a natural rexinoid—potential for treatment and prevention of diabetes. *Med. Hypotheses.* 56:217–9.
- McCarty, M.F. 2007. Clinical potential of *Spirulina* as a source of phycocyanobilin. *J. Med. Food.* 10:566–70.
- McCord, J.M. & Fridovich, I. 1969. Su peroxide dismutase an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244:6049–55.
- Mccully, M.E. 1968. Histological Studies on the Genus *Fucus*. *Protoplasma.* 62:20–40.
- McKinlay, A.F., Diffey, B.L. & Passchier, W.F. 1987. Human exposure to ultraviolet radiation: risks and regulations. *Hum. Expo. to Ultrav. Radiat. Risks Regul.*
- Mehler, A.H. 1951a. Studies on reactions of illuminated chloroplasts: I. Mechanism of the reduction of oxygen and other hill reagents. *Arch. Biochem. Biophys.* 33:65–77.

- Mehler, A.H. 1951b. Studies on reactions of illuminated chloroplasts. II. Stimulation and inhibition of the reaction with molecular oxygen. *Arch. Biochem. Biophys.* 34:339–51.
- Melo, R.A., Harger, B.W. & Neushul, M. 1991. *Gelidium* cultivation in the sea. *Hydrobiologia.* 221:91–106.
- Mendes, L.F., Zambotti-Villela, L., Colepicolo, P., Marinho-Soriano, E., Stevani, C.V. & Yokoya, N.S. 2013. Metal cation toxicity in the alga *Gracilaria domingensis* as evaluated by the daily growth rates in synthetic seawater. *J. Appl. Phycol.* 25:1939–47.
- Menetrez, M.Y. 2012. An overview of algae biofuel production and potential environmental impact. *Environ. Sci. Technol.* 46:7073–85.
- Mercurio, D.G., Wagemaker, T.A.L., Alves, V.M., Benevenuto, C.G., Gaspar, L.R. & Campos, P.M. 2015. In vivo photoprotective effects of cosmetic formulations containing UV filters, vitamins, *Ginkgo biloba* and red algae extracts. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 153:121–6.
- Miksa, S., Lutz, D. & Guy, C. 2015. New approach for a reliable *in vitro* sun protection factor method Part I: Principle and mathematical aspects. *Int. J. Cosmet. Sci.* 37:555–66.
- Miksa, S., Lutz, D., Guy, C. & Delamour, E. 2016. New approach for a reliable *in vitro* sun protection factor method – Part II : Practical aspects and implementations. 504–11.
- Millao, S. & Uquiche, E. 2016. Extraction of oil and carotenoids from pelletized microalgae using supercritical carbon dioxide. *J. Supercrit. Fluids.*
- Milledge, J.J., Smith, B., Dyer, P.W. & Harvey, P. 2014. Macroalgae-derived biofuel: a review of methods of energy extraction from seaweed biomass. *Energies.* 7:7194–222.
- Miller, S.A., Coelho, S.G., Yamaguchi, Y., Hearing, V.J., Beer, J.Z. & de Gruijl, F. 2017. The Evaluation of Non-invasive Measurements of Erythema as a Potential Surrogate for DNA Damage in Repetitively UV-exposed Human Skin. *Photochem. Photobiol.*
- Mishra, S.K., Suh, W.I., Farooq, W., Moon, M., Shrivastav, A., Park, M.S. & Yang, J.W. 2014. Rapid quantification of microalgal lipids in aqueous medium by a simple colorimetric method. *Bioresour. Technol.* 155:330–3.
- Misonou, T., Saitoh, J., Oshiba, S., Tokitomo, Y., Maegawa, M., Inoue, Y., Hori, H. et al. 2003. UV-absorbing substance in the red alga *Porphyra yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta) block thymine photodimer production. *Mar. Biotechnol.* 5:194–200.
- Miyake, C. & Asada, K. 1996. Inactivation mechanism of ascorbate peroxidase at low concentrations of ascorbate; hydrogen peroxide decomposes compound I of ascorbate peroxidase. *Plant cell Physiol.* 37:423–30.
- Miyamura, Y., Coelho, S.G., Schlenz, K., Batzer, J., Smuda, C., Choi, W., Brenner, M. et al. 2011. The deceptive nature of UVA tanning versus the modest protective effects of UVB tanning on human skin. *Pigment Cell Melanoma Res.* 24:136–47.
- Miyashita, K. 2014. Marine antioxidants: polyphenols and carotenoids from algae. *Antioxidants Funct. Components Aquat. Foods.* Ed. by Kristinsson HG. West Sussex, UK John Wiley Sons Ltd. 219–29.
- Moffitt, C.M. & Cajas-Cano, L. 2014. Blue growth: the 2014 FAO state of world fisheries and aquaculture. *Fisheries.* 39:552–3.
- Mohamed, S., Hashim, S.N. & Rahman, H.A. 2012. Seaweeds: a sustainable functional food for complementary and alternative therapy. *Trends Food Sci. Technol.* 23:83–96.
- Monteiro-Riviere, N.A., Wiench, K., Landsiedel, R., Schulte, S., Inman, A.O. & Riviere, J.E. 2011. Safety evaluation of sunscreen formulations containing titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in UVB sunburned skin: an *in vitro* and *in vivo* study. *Toxicol. Sci.* 123:264–80.
- Montgomery, D. C. (2001). Design and Analysis of Experiments, John Wiley & Sons. New York, 64-65.

- Montse, B. 2001. Algas, las verduras del mar. *Salud vida Nat. Océano*.
- Moo-Puc, R., Robledo, D. & Freile-Pelegrin, Y. 2008. Evaluation of selected tropical seaweeds for *in vitro* anti-trichomonal activity. *J. Ethnopharmacol.* 120:92–7.
- Moral-Plaza, M. 2010. Búsqueda de nuevos ingredientes funcionales naturales procedentes de algas. Universidad Autónoma de Madrid, 345 pp.
- Morliere, P., Annie, M. & Isabelle, T. 1995. Action spectrum for UV-inducen lipid peroxidation in cultured human skin fibroblast. *Free Radic. Biol. Med.* 19:365–71.
- Morris, H.J., Carrillo, O., Almarales, A., Bermúdez, R.C., Lebeque, Y., Fontaine, R., Llauroadó, G. et al. 2007. Immunostimulant activity of an enzymatic protein hydrolysate from green microalga *Chlorella vulgaris* on undernourished mice. *Enzyme Microb. Technol.* 40:456–60.
- Mortensen, A. 2006. Carotenoids and other pigments as natural colorants. *Pure Appl. Chem.* 78:1477–91.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 65:55–63.
- Mouille, G., Maddelein, M., Libessart, N., Talaga, P., Decq, a, Delrue, B. & Ball, S. 1996. Preamylopectin processing: a mandatory step for starch biosynthesis in plants. *Plant Cell.* 8:1353–66.
- Moyal, D. 2004. Prevention of ultraviolet-induced skin pigmentation. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 20:243–7.
- Moyal, D., Chardon, A. & Kollias, N. 2000. UVA protection efficacy of sunscreens can be determined by the persistent pigment darkening (PPD) method. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 16:250–5.
- Mufti, J. 2003. UV Protection. *Househ. Pers. Prod. Ind.*
- Müller, N.E., Hauler, O. & Schenk, H.E.A. 1997. The Phycobiliproteins Within the Cyanoplasts of *Cyanophora paradoxa* Store Carbon, Nitrogen, and Sulfur for the Whole Cell. In *Eukaryotism and Symbiosis*. Springer, pp. 252–60.
- Murata, N., Takahashi, S., Nishiyama, Y. & Allakhverdiev, S.I. 2007. Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Bioenergetics.* 1767:414–21.
- Najdenski, H.M., Gigova, L.G., Iliev, I.I., Pilarski, P.S., Lukavský, J., Tsvetkova, I. V, Ninova, M.S. et al. 2013. Antibacterial and antifungal activities of selected microalgae and cyanobacteria. *Int. J. Food Sci. Technol.* 48:1533–40.
- Nakashima, Y., Ohta, S. & Wolf, A.M. 2017. Blue light-induced oxidative stress in live skin. *Free Radic. Biol. Med.* 108:300–10.
- Namikoshi, M. & Rinehart, K.L. 1996. Bioactive compounds produced by cyanobacteria. *J. Ind. Microbiol.* 17:373–84.
- Nash, J.F. 2006. Human safety and efficacy of ultraviolet filters and sunscreen products. *Dermatol. Clin.* 24:35–51.
- Neish, A.C., Shacklock, P.F., Fox, C.H. & Simpson, F.J. 1977. The cultivation of *Chondrus crispus*. Factors affecting growth under greenhouse conditions. *Can. J. Bot.* 55:2263–71.
- Neori, A., Chopin, T., Troell, M., Buschmann, A.H., Kraemer, G.P., Halling, C., Shpigel, M. et al. 2004. Integrated aquaculture: Rationale, evolution and state of the art emphasizing seaweed biofiltration in modern mariculture. *Aquaculture.* 231:361–91.
- Newman, D.J. & Cragg, G.M. 2016. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* 79:629–61.
- Noctor, G. & Foyer, C.H. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Biol.* 49:249–79.

- Noda, H. 1993. Health benefits and nutritional properties of nori. *J. Appl. Phycol.* 5:255–8.
- Norziah, M.H. & Ching, C.Y. 2000. Nutritional composition of edible seaweed *Gracilaria changgi*. *Food Chem.* 68:69–76.
- Novza, Y.A. & Popova, E.M. 2016. Flavonoids: chemistry and biological activities. *Probl. Environ. Biotechnol.*
- Núñez-Resendiz, M.L., Dreckmann, K.M., Senties, A., Díaz-Larrea, J. & Zuccarello, G.C. 2015. Genetically recognizable but not morphologically: the cryptic nature of *Hydropuntia cornea* and *H. usneoides* (Gracilariales, Rhodophyta) in the Yucatan Peninsula. *Phycologia.* 54:407–16.
- O'Brien, T.P., Feder, N. & McCully, M.E. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma.* 59:368–73.
- O'Sullivan, A.M., O'Callaghan, Y.C., O'Grady, M.N., Queguineur, B., Hanniffy, D., Troy, D.J., Kerry, J.P. et al. 2011. In vitro and cellular antioxidant activities of seaweed extracts prepared from five brown seaweeds harvested in spring from the west coast of Ireland. *Food Chem.* 126:1064–70.
- Obadijah, A., Kannan, R., Ramasubbu, A. & Kumar, S.V. 2012. Studies on the effect of antioxidants on the long-term storage and oxidation stability of *Pongamia pinnata* (L.) Pierre biodiesel. *Fuel Process. Technol.* 99:56–63.
- Obata, M., Toda, T. & Taguchi, S. 2009. Using chlorophyll fluorescence to monitor yields of microalgal production. *J. Appl. Phycol.* 21:315–9.
- Oda, Y., Zhang, Q., Matsunaga, S., Fujita, M.J. & Sakai, R. 2017. Two New Mycosporine-Like Amino Acids LC-343 and Mycosporine-ethanolamine from the Micronesian Marine Sponge *Lendenfeldia chondrodes*. *Chem. Lett.* 46.
- Oehlke, K., Heins, A., Stöckmann, H., Sönnichsen, F. & Schwarz, K. 2011. New insights into the antioxidant activity of Trolox in o/w emulsions. *Food Chem.* 124:781–7.
- Okamoto, O.K., Pinto, E., Latorre, L.R., Bechara, E.J.H. & Colepicolo, P. 2001. Antioxidant modulation in response to metal-induced oxidative stress in algal chloroplasts. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 40:18–24.
- Olaizola, M. 2003. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomol. Eng.* 20:459–66.
- Öquist, G., Chow, W.S. & Anderson, J.M. 1992. Photoinhibition of photosynthesis represents a mechanism for the long-term regulation of photosystem II. *Planta.* 186:450–60.
- Ördög, V., Stirk, W.A., Lenobel, R., Bancířová, M., Strnad, M., Van Staden, J., Szigeti, J. et al. 2004. Screening microalgae for some potentially useful agricultural and pharmaceutical secondary metabolites. *J. Appl. Phycol.* 16:309–14.
- Orellana, M. V, Petersen, T.W. & Van Den Engh, G. 2004. UV-excited blue autofluorescence of *Pseudonitzschia multiseries* (Bacillariophyceae) 1. *J. Phycol.* 40:705–10.
- Ortega, C. & Leticia, C. 2015. Cultivo de algas mediante sistema de cuerdas en la bahía de Cádiz. Universidad de Cádiz, 41 pp.
- Osterwalder, U., Sohn, M. & Herzog, B. 2014. Global state of sunscreens. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 30:62–80.
- Ouameur, A.A., Marty, R. & Tajmir-Riahi, H.A. 2005. Human serum albumin complexes with chlorophyll and chlorophyllin. *Biopolymers.* 77:129–36.
- Overbaugh, J.M. & Fall, R. 1982. Detection of glutathione peroxidases in some microalgae. *FEMS Microbiol. Lett.* 13:371–5.
- Oyamada, C., Kaneniwa, M., Ebitani, K., Murata, M. & Ishihara, K. 2008. Mycosporine-like amino acids extracted from scallop (*Patinopecten yessoensis*) ovaries: UV protection and growth stimulation

- activities on human cells. *Mar. Biotechnol.* 10:141–50.
- Pakker, H., Beekman, C. & Breeman, A. 2000a. Efficient photoreactivation of UVBR-induced DNA damage in the sublittoral macroalga *Rhodomenia pseudopalmata* (Rhodophyta). *Eur. J. Phycol.* 35:109–14.
- Pakker, H., Martins, R.S.T., Boelen, P., Buma, A.G.J., Nikaido, O. & Breeman, A.M. 2000b. Effects of temperature on the photoreactivation of ultraviolet-b–induced dna damage in *Palmaria palmata* (Rhodophyta). *J. Phycol.* 36:334–41.
- Pallela, R., Na-Young, Y. & Kim, S.K. 2010. Anti-photoaging and photoprotective compounds derived from marine organisms. *Mar. Drugs.* 8:1189–202.
- Pandey, R., Chauhan, S. & Singhal, G.S. 1997. UVB-induced photodamage to phycobilisomes of *Synechococcus* sp. PCC 7942. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 40:228–32.
- Pangestuti, R. & Kim, S.K. 2015. Carotenoids, bioactive metabolites derived from seaweeds. In *Springer Handbook of Marine Biotechnology*. Springer, pp. 816–21.
- Parages, M.L., Rico, R.M., Abdala-Díaz, R.T., Chabrillón, M., Sotiroidis, T.G. & Jiménez, C. 2012. Acidic polysaccharides of *Arthrospira (Spirulina) platensis* induce the synthesis of TNF- α in RAW macrophages. *J. Appl. Phycol.* 24:1537–46.
- Parisi, A. V & Kimlin, M.G. 1999. Horizontal and sun-normal spectral biologically effective ultraviolet irradiances. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 53:70–4.
- Parrish, J.A., Jaenicke, K.F. & Anderson, R. 1982. Erythema and melanogenesis action spectra of normal human skin. *Photochem. Photobiol.* 36:187–91.
- Pascual, G., Avgustinova, A., Mejetta, S., Martín, M., Castellanos, A., Attolini, C.S.O., Berenguer, A. et al. 2016. Targeting metastasis-initiating cells through the fatty acid receptor CD36. *Nature.* 541:41–5.
- Patarra, R.F., Paiva, L., Neto, A.I., Lima, E. & Baptista, J. 2011. Nutritional value of selected macroalgae. *J. Appl. Phycol.* 23:205–8.
- Patil, S., Fegade, B., Zamindar, U. & Bhaskar, V.H. 2015. Determination of sun protection effect of herbal sunscreen cream. *World J. Pharm. Pharm. Sci.* 4:1554–65.
- Paul, C. & Pohnert, G. 2011. Production and role of volatile halogenated compounds from marine algae. *Nat. Prod. Rep.* 28:186–95.
- Pavia, H. & Toth, G.B. 2000. Influence of light and nitrogen on the phlorotannin content of the brown seaweeds *Ascophyllum nodosum* and *Fucus vesiculosus*. *Hydrobiologia.* 440:299–305.
- Pavia, H., Cervin, G., Lindgren, A. & Aberg, P. 1998. Effects of UV-B radiation and simulated herbivory on phlorotannins in the brown alga *Ascophyllum nodosum*. *Oceanogr. Lit. Rev.* 3:523–4.
- Pearse, A.G.E. 1985. Carbohydrates and mucosubstances. *Histochem. Theor. Appl.* 2:675–753.
- Peckol, P. & Rivers, J.S. 1996. Contribution by macroalgal mats to primary production of a shallow embayment under high and low nitrogen-loading rates. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 43:311–25.
- Pedersén, M., Saenger, P. & Fries, L. 1974. Simple brominated phenols in red algae. *Phytochemistry.* 13:2273–9.
- Pentón-Rol, G., Marín-Prida, J., Pardo-Andreu, G., Martínez-Sánchez, G., Acosta-Medina, E.F., Valdivia-Acosta, A., Lagumersindez-Denis, N. et al. 2011a. C-Phycocyanin is neuroprotective against global cerebral ischemia/reperfusion injury in gerbils. *Brain Res. Bull.* 86:42–52.
- Pentón-Rol, G., Martínez-Sánchez, G., Cervantes-Llanos, M., Lagumersindez-Denis, N., Acosta-Medina, E.F., Falcón-Cama, V., Alonso-Ramírez, R. et al. 2011b. C-Phycocyanin ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis and induces regulatory T cells. *Int. Immunopharmacol.* 11:29–38.
- Perea, S.E. 2016. Solar Filters: A Strategy of Photoprotection. In *Applied Photochemistry*. Springer, pp.

459–78.

- Pereira, M.G., Benevides, N.M.B., Melo, M.R.S., Valente, A.P., Melo, F.R. & Mourão, P.A.S. 2005. Structure and anticoagulant activity of a sulfated galactan from the red alga, *Gelidium crinale*. Is there a specific structural requirement for the anticoagulant action? *Carbohydr. Res.* 340:2015–23.
- Pereira, R. & Yarish, C. 2008. Mass Production of Marine Macroalgae. *Encycl. Ecol.* 2236–47.
- Pereira, R. & Yarish, C. 2010. The role of *Porphyra* in sustainable culture systems: physiology and applications. In *Seaweeds and Their Role in Globally Changing Environments*. Springer, pp. 339–54.
- Pérez, J.L., Hernández, I., Vergara, J.J., Brun, F.G. & León-González, Á. 2016. ¿Las algas se comen? Un Periplo por La Biología, La Historia, Las Curiosidades y La Gastronomía. 1st ed. CEIMAR. 336 pp.
- Person, L. 2014. Global hadoop market. *Allied Mark. Res.*
- Pessoa, M.F. 2012. Harmful effects of UV radiation in algae and aquatic macrophytes-a review. *Emirates J. Food Agric.* 24:510.
- Pimentel, D. & Pimentel, M.H. 2007. Food, energy, and society. CRC press.
- Pimentel, D. 2012. Global economic and environmental aspects of biofuels. CRC Press.
- Pissavini, M., Marguerie, S., Dehais, A., Ferrero, L. & Zastrow, L. 2009. Characterizing roughness: a new substrate to measure SPF. *Cosmet. Toilet.* 124.
- Planck, M. 1901. On the law of distribution of energy in the normal spectrum. *Ann. Phys.* 4:1.
- Plaza, M., Santoyo, S., Jaime, L., García-Blairsy Reina, G., Herrero, M., Señoráns, F.J., Ibáñez, E. et al. 2010. Screening for bioactive compounds from algae. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51:450–5.
- Plaza, M., Santoyo, S., Jaime, L., García-Blairsy Reina, G., Herrero, M., Señoráns, F.J. & Ibáñez, E. 2010. Screening for bioactive compounds from algae. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51:450–5.
- Polyakov, N.E., Leshina, T. V., Konovalova, T.A. & Kispert, L.D. 2001. Carotenoids as scavengers of free radicals in a Fenton reaction: antioxidants or pro-oxidants? *Free Radic. Biol. Med.* 31:398–404.
- Popov, A., Zhao, X., Zvyagin, A., Lademann, J., Roberts, M., Sanchez, W., Priezzhev, A. et al. 2010. ZnO and TiO₂ particles: a study on nanosafety and photoprotection. In *Proc SPIE*. p. 77153G.
- Poppe, F., Schmidt, R.R.A.M.R., Hanelt, D. & Wiencke, C. 2003. Effects of UV radiation on the ultrastructure of several red algae. *Phycol. Res.* 51:11–9.
- Portwich, A. & Garcia-Pichel, F. 2000. A novel prokaryotic UVB photoreceptor in the cyanobacterium *Chlorogloeopsis* PCC 6912. *Photochem. Photobiol.* 71:493–8.
- Provasoli, L. 1963. Growing marine seaweeds. In *Proc Int Seaweed Symp.* p. 17.
- Provasoli, L., McLaughlin, J.J. a & Droop, M.R. 1957. The development of artificial media for marine algae. *Arch. Mikrobiol.* 25:392–428.
- Pueschel, C.M. 1980. A reappraisal of the cytochemical properties of rhodophycean pit plugs. *Phycologia.* 19:210–7.
- Pugh, N., Ross, S.A., ElSohly, H.N., ElSohly, M.A. & Pasco, D.S. 2001. Isolation of three high molecular weight polysaccharide preparations with potent immunostimulatory activity from *Spirulina platensis*, *Aphanizomenon flos-aquae* and *Chlorella pyrenoidosa*. *Planta Med.* 67:737–42.
- Puri, M. 2017. Algal biotechnology for pursuing omega-3 fatty acid (bioactive) production. *Microbiol. Aust.* 38:85–8.
- Qasim, R. 1991. Amino acid composition of some common seaweeds. *Pak. J. Pharm. Sci.* 4:49–54.
- Qi, J. & Kim, S.M. 2017. Characterization and immunomodulatory activities of polysaccharides extracted from green alga *Chlorella ellipsoidea*. *Int. J. Biol. Macromol.* 95:106–14.

- Qi, Z., Liu, H., Li, B., Mao, Y., Jiang, Z., Zhang, J. & Fang, J. 2010. Suitability of two seaweeds, *Gracilaria lemaneiformis* and *Sargassum pallidum*, as feed for the abalone *Haliotis discus hannai* Ino. *Aquaculture*. 300:189–93.
- Qu, S., Zhang, L., Zhang, X. & Li, Z. 2014. Proceedings of the 2012 International Conference on Applied Biotechnology (ICAB 2012). *Lect. Notes Electr. Eng.* 251:1499–506.
- Rabiei, R., Phang, S.M., Lim, P.E., Salleh, A., Sohrabipour, J., Ajdari, D. & Zarshenas, G.A. 2016. Productivity, biochemical composition and biofiltering performance of agarophytic seaweed, *Gelidium elegans* (Red algae) grown in shrimp hatchery effluents in Malaysia. *Iran. J. Fish. Sci.* 15:53–74.
- Raikaar, S. V., Iima, M. & Fujita, Y. 2001. Effect of temperature, salinity and light intensity on the growth of *Gracilaria* spp.(Gracilariales, Rhodophyta) from Japan, Malaysia and India.
- Ralph, P.J., Wilhelm, C., Lavaud, J., Jakob, T., Petrou, K. & Kranz, S.A. 2010. Fluorescence as a tool to understand changes in photosynthetic electron flow regulation. In *Chlorophyll a Fluorescence in Aquatic Sciences: Methods and Applications*. Springer, pp. 75–89.
- Ranjbarfordoei, A., Samson, R. & Van Damme, P. 2011. Photosynthesis performance in sweet almond [*Prunus dulcis* (Mill) D. Webb] exposed to supplemental UV-B radiation. *Photosynthetica*. 49:107.
- Rao, P.P.S. 1998. Biological investigations of Indian phaeophyceae: 17. Seasonal variation of antibacterial activity of total sterols obtained from frozen samples of *Sargassum johnstonii* Setchell et Gardner.
- Rastogi, R.P. & Incharoensakdi, A. 2014. UV radiation-induced biosynthesis, stability and antioxidant activity of mycosporine-like amino acids (MAAs) in a unicellular cyanobacterium *Gloeocapsa* sp. CU2556. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 130:287–92.
- Rastogi, R.P. & Sinha, R.P. 2009. Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* 27:521–39.
- Rastogi, R.P., RSonani, R., Incharoensakdi, A. & Madamwar, D. 2017. Sun-Screening Biomolecules in Microalgae: Role in UV-Photoprotection. *UV-B Radiat. From Environ. Stress. to Regul. Plant Growth*.
- Raven, J.A. & Kübler, J.E. 2002. New light on the scaling of metabolic rate with the size of algae. *J. Phycol.* 38:11–6.
- Rawat, I., Kumar, R.R., Mutanda, T. & Bux, F. 2013. Biodiesel from microalgae: a critical evaluation from laboratory to large scale production. *Appl. Energy*. 103:444–67.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26:1231–7.
- Renner, G., Audebert, F., Burfeindt, J., Calvet, B., Caratas-Perifan, M., Leal, M.E., Gorni, R. et al. 2017. Cosmetics Europe guidelines on the management of undesirable effects and reporting of serious undesirable effects from cosmetics in the European Union. *Cosmetics*. 4:1.
- Repetto, M. 2003. Métodos alternativos. Toxicidad *in vitro*. In *Toxicología Fundamental*. Ediciones Díaz de Santos, pp. 303–5.
- Rice-Evans, C., Miller, N. & Paganga, G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* 2:152–9.
- Richardson, C.E., Hennebelle, M., Otoki, Y., Zamora, D., Yang, J., Hammock, B.D. & Taha, A.Y. 2017. Lipidomic Analysis of Oxidized Fatty Acids in Plant and Algae Oils. *J. Agric. Food Chem.* 65:1941–51.
- Ritchie, R.J. 2008. Fitting light saturation curves measured using modulated fluorometry. *Photosynth. Res.* 96:201–15.
- Rico, J.M. 1991. Field studies and growth experiments on *Gelidium latifolium* from Asturias (northern

- Spain). *Hydrobiologia*. 221:67–75.
- Roberts, T. & Upham, P. 2012. Prospects for the use of macro-algae for fuel in Ireland and the UK: An overview of marine management issues. *Mar. Policy*. 36:1047–53.
- Robledo, D., Navarro-Angulo, L., Valdes Lozano, D. & Freile-Pelegrin, Y. 2014. Nutrient removal efficiency of *Hydropuntia cornea* in an integrated closed recirculation system with pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis*. *Aquac. Res.* 45:1648–58.
- Roesijadi, G., Jones, S.B., Snowden-Swan, L.J. & Zhu, Y. 2010. Macroalgae as a biomass feedstock: a preliminary analysis, PNNL 19944. *Pacific Northwest Natl. Lab. Richl.*
- Roleda, M.Y., Hanelt, D., Kräbs, G. & Wiencke, C. 2004. Morphology, growth, photosynthesis and pigments in *Laminaria ochroleuca* (Laminariales, Phaeophyta) under ultraviolet radiation. *Phycologia*. 43:603–13.
- Roleda, M.Y., Nyberg, C.D. & Wulff, A. 2012. UVR defense mechanisms in eurytopic and invasive *Gracilaria vermiculophylla* (Gracilariales, Rhodophyta). *Physiol. Plant.* 146:205–16.
- Romano, G., Costantini, M., Sansone, C., Lauritano, C., Ruocco, N. & Ianora, A. 2017. Marine microorganisms as a promising and sustainable source of bioactive molecules. *Mar. Environ. Res.* 128:58–69.
- Romay, C., González, R., Ledón, N., Remirez, D. & Rimbau, V. 2003. C-phycoerythrin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. *Curr. Protein Pept. Sci.* 4:207–16.
- Romay, C.H., Armesto, J., Remirez, D., González, R., Ledón, N. & García, I. 1998. Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycoerythrin from blue-green algae. *Inflamm. Res.* 47:36–41.
- Rothe, J., Hays, D. & Benemann, J. 2012. New Fuels: Macroalgae. *Futur. Transp. Fuels Study, Natl. Pet. Counc. Work. Doc. NPC Futur. Transp. Fuels Study*.
- Roy, S. 2000. Strategies for the minimisation of UV-induced damage. *Eff. UV Radiat. Mar. Environ.* 177–205.
- Ruban, A. V & Horton, P. 1995. Regulation of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in plants. *Funct. Plant Biol.* 22:221–30.
- Rüdiger, W. & López-Figueroa, F. 1992. Photoreceptors in algae. *Photochem. Photobiol.* 55:949–54.
- Runcie, J.W. & Riddle, M.J. 2012. Estimating primary productivity of marine macroalgae in East Antarctica using in situ fluorometry. *Eur. J. Phycol.* 47:449–60.
- Rundel, R.D. 1983. Action spectra and estimation of biologically effective UV radiation. *Physiol. Plant.* 58:360–6.
- Ryu, J., Park, S.J., Kim, I.-H., Choi, Y. & Nam, T.-J. 2014. Protective effect of porphyra-334 on UVA-induced photoaging in human skin fibroblasts. *Int. J. Mol. Med.* 796–803.
- Sabeena Farvin, K.H. & Jacobsen, C. 2013. Phenolic compounds and antioxidant activities of selected species of seaweeds from Danish coast. *Food Chem.* 138:1670–81.
- Saeidnia, S., Perme, P., Gohari, A.R. & Mashinchian-Moradi, A. 2012. *Gracilariopsis persica*, from Persian Gulf, Contains Bioactive Sterols. *Iran. J. Pharm. Res.* 11:845–9.
- Sahena, F., Zaidul, I.S.M., Jinap, S., Saari, N., Jahurul, H.A., Abbas, K.A. & Norulaini, N.A. 2009. PUFAs in fish: extraction, fractionation, importance in health. *Compr. Rev. food Sci. food Saf.* 8:59–74.
- Sakthivel, R., Muniasamy, S., Archunan, G. & Devi, K.P. 2016. *Gracilaria edulis* exhibit antiproliferative activity against human lung adenocarcinoma cell line A549 without causing adverse toxic effect *in vitro* and *in vivo*. *Food Funct.* 7:1155–65.
- Sánchez-Quiles, D. & Tovar-Sánchez, A. 2014. Sunscreens as a source of hydrogen peroxide production in coastal waters. *Environ. Sci. Technol.* 48:9037–42.

- Sangwan, S., Rao, D. V & Sharma, R.A. 2010. A review on *Pongamia Pinnata* (L.) Pierre: A great versatile leguminous plant. *Nat. Sci.* 8:130–9.
- Sanina, N.M., Goncharova, S.N. & Kostetsky, E.Y. 2004. Fatty acid composition of individual polar lipid classes from marine macrophytes. *Phytochemistry*. 65:721–30.
- Sarikurkcü, C., Arisoy, K., Tepe, B., Cakir, A., Abali, G. & Mete, E. 2009. Studies on the antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of *Vitex agnus castus* L. fruits from Turkey. *Food Chem. Toxicol.* 47:2479–83.
- Sarker, P.K., Kapuscinski, A.R., Lanois, A.J., Livesey, E.D., Bernhard, K.P. & Coley, M.L. 2016. Towards sustainable aquafeeds: complete substitution of fish oil with marine microalga *Schizochytrium* sp. improves growth and fatty acid deposition in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *PLoS One*. 11:e0156684.
- Sarma, A.K., Konwer, D. & Bordoloi, P.K. 2005. A comprehensive analysis of fuel properties of biodiesel from Koroch seed oil. *Energy & fuels*. 19:656–7.
- Sato, M., Fujimoto, L., Sakai, T., Aimoto, T., Kimura, R. & Murata, T. 1986. Effect of sodium copper chlorophyllin on lipid peroxidation. IX On the antioxidative components in commercial preparations of sodium copper chlorophyllin. *Chem. Pharm. Bull.* 34:2428–34.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C. & Jiménez, L. 2005. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45:287–306.
- Schepetkin, I.A. & Quinn, M.T. 2006. Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *Int. Immunopharmacol.* 6:317–33.
- Scheuer, P.J. 2013. Marine natural products: chemical and biological perspectives. Academic Press.
- Schmid, D., Cornelia, S. & Fred, Z. 2004. UV-A sunscreen from red algae for protection against premature skin aging. *Cosmetics*. 139–43.
- Schmid, D., Schürch, C. & Züllig, F. 2006. Mycosporine-like amino acids from red algae protect against premature skin-aging. *Euro Cosmet.* 9:1–4.
- Schmid, M. & Stengel, D.B. 2015. Intra-thallus differentiation of fatty acid and pigment profiles in some temperate Fucales and Laminariales. *J. Phycol.* 51:25–36.
- Schmidt, É.C., dos Santos, R., Horta, P.A., Maraschin, M. & Bouzon, Z.L. 2010. Effects of UVB radiation on the agarophyte *Gracilaria domingensis* (Rhodophyta, Gracilariales): Changes in cell organization, growth and photosynthetic performance. *Micron*. 41:919–30.
- Schmidt, É.C., dos Santos, R.W., de Faveri, C., Horta, P.A., de Paula Martins, R., Latini, A., Ramlov, F. et al. 2012a. Response of the agarophyte *Gelidium floridanum* after *in vitro* exposure to ultraviolet radiation B: changes in ultrastructure, pigments, and antioxidant systems. *J. Appl. Phycol.* 24:1341–52.
- Schmidt, É.C., Pereira, B., dos Santos, R.W., Gouveia, C., Costa, G.B., Faria, G.S.M., Scherner, F. et al. 2012b. Responses of the macroalgae *Hypnea musciformis* after *in vitro* exposure to UV-B. *Aquat. Bot.* 100:8–17.
- Schmidt, É.C., Scariot, L.A., Rover, T. & Bouzon, Z.L. 2009. Changes in ultrastructure and histochemistry of two red macroalgae strains of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales), as a consequence of ultraviolet B radiation exposure. *Micron*. 40:860–9.
- Schoefs, B. 2002. Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis. *Trends food Sci. Technol.* 13:361–71.
- Schoop, V.M., Fusenig, N.E. & Mirancea, N. 1999. Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* 112:343–53.

- Schreiber, U. & Bilger, W. 1993. Progress in chlorophyll fluorescence research: major developments during the past years in retrospect. *In Progress in Botany/Fortschritte Der Botanik*. Springer, pp. 151–73.
- Schreiber, U. 2004. Pulse-amplitude-modulation (PAM) fluorometry and saturation pulse method: an overview. *Chlorophyll a Fluoresc.* 279–319.
- Schreiber, U., Bilger, W. & Neubauer, C. 1994. Chlorophyll Fluorescence as a Nonintrusive Indicator for Rapid Assessment on *In Vivo* Photosynthesis. *In Ecophysiology of Photosynthesis*. pp. 49–70.
- Schreiber, U., Endo, T., Mi, H. & Asada, K. 1995. Quenching analysis of chlorophyll fluorescence by the saturation pulse Method: particular aspects relating to the study of eukaryotic algae and Cyanobacteria. *Plant Cell Physiol.* 36:873–82.
- Schreiber, U., Schliwa, U. & Bilger, W. 1986. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth. Res.* 10:51–62.
- Schreiber, U., Walz, H. & Kolbowski, J. 2003. Propagation of spatial variations of chlorophyll fluorescence parameters in dandelion leaves induced by laser spot heating. *PAM News.* 1:1–18.
- Schuchardt, U., Sercheli, R. & Vargas, R.M. 1998. Transesterification of vegetable oils: a review. *J. Braz. Chem. Soc.* 9:199–210.
- Schuenhoff, A., Mata, L. & Santos, R. 2006. The tetrasporophyte of *Asparagopsis armata* as a novel seaweed biofilter. *Aquaculture.* 252:3–11.
- Schuenhoff, A., Shpigel, M., Lupatsch, I., Ashkenazi, A., Msuya, F.E. & Neori, A. 2003. A semi-recirculating, integrated system for the culture of fish and seaweed. *Aquaculture.* 221:167–81.
- Seemann, J.R., Sharkey, T.D., Wang, J. & Osmond, C.B. 1987. Environmental effects on photosynthesis, nitrogen-use efficiency, and metabolite pools in leaves of sun and shade plants. *Plant Physiol.* 84:796–802.
- Sekar, S. & Chandramohan, M. 2008. Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization. *J. Appl. Phycol.* 20:113–36.
- Sendra, M., Sánchez-Quiles, D., Blasco, J., Moreno-Garrido, I., Lubián, L.M., Pérez-García, S. & Tovar-Sánchez, A. 2017. Effects of TiO₂ nanoparticles and sunscreens on coastal marine microalgae: Ultraviolet radiation is key variable for toxicity assessment. *Environ. Int.* 98:62–8.
- Setlow, R.B. 1974. The wavelengths in sunlight effective in producing skin cancer: a theoretical analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 71:3363–6.
- Shaath, N.A. 2016. The Chemistry of Ultraviolet Filters. *In Principles and Practice of Photoprotection*. Springer, pp. 143–57.
- Shah, M.M.R., Liang, Y., Cheng, J.J. & Daroch, M. 2016. A staxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: from single cell to high value commercial products. *Front. Plant Sci.* 7.
- Shanab, S.M.M., Mostafa, S.S.M., Shalaby, E.A. & Mahmoud, G.I. 2012. Aqueous extracts of microalgae exhibit antioxidant and anticancer activities. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2:608–15.
- Shao, P., Chen, X. & Sun, P. 2014. Chemical characterization, antioxidant and antitumor activity of sulfated polysaccharide from *Sargassum horneri*. Elsevier Ltd. 260–269 pp.
- Sharma, D., Kumar, S.S. & Sainis, K.B. 2007. Antiapoptotic and immunomodulatory effects of chlorophyllin. *Mol. Immunol.* 44:347–59.
- Sharma, K.K., Schuhmann, H. & Schenk, P.M. 2012. High lipid induction in microalgae for biodiesel production. *Energies.* 5:1532–53.
- Sheih, I.C., Fang, T.J., Wu, T.K. & Lin, P.H. 2010. Anticancer and antioxidant activities of the peptide fraction from algae protein waste. *J. Agric. Food Chem.* 58:1202–7.

- Sheih, I.C., Wu, T.K. & Fang, T.J. 2009. Antioxidant properties of a new antioxidative peptide from algae protein waste hydrolysate in different oxidation systems. *Bioresour. Technol.* 100:3419–25.
- Shelly, K., Roberts, S., Heraud, P. & Beardall, J. 2005. Interactions between UV-B exposure and phosphorus nutrition. I. Effects on growth, phosphate uptake, and chlorophyll fluorescence. *J. Phycol.* 41:1204–11.
- Shick, J.M. & Dunlap, W.C. 2002. Mycosporine-like amino acids and related gadusols: biosynthesis, accumulation, and UV-protective functions in aquatic organisms. *Annu. Rev. Physiol.* 64:223–62.
- Shih, C.M., Cheng, S.N., Wong, C.S., Kuo, Y.L. & Chou, T.C. 2009. Antiinflammatory and antihyperalgesic activity of C-phycoyanin. *Anesth. Analg.* 108:1303–10.
- Shiu, C.T. & Lee, T.M. 2005. Ultraviolet-B-induced oxidative stress and responses of the ascorbate-glutathione cycle in a marine macroalga *Ulva fasciata*. *J. Exp. Bot.* 56:2851–65.
- Sidhu, K.S. 2003. Health benefits and potential risks related to consumption of fish or fish oil. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 38:336–44.
- Sies, H. & Stahl, W. 2004. Carotenoids and UV protection. *Photochem. Photobiol. Sci.* 3:749–52.
- Sies, H. 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* 82:291–5.
- Sigurdson, G.T., Tang, P. & Giusti, M.M. 2017. Natural Colorants: Food Colorants from Natural Sources. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 8:261–80.
- Silva, D.M., Valente, L.M.P., Sousa-Pinto, I., Pereira, R., Pires, M.A., Seixas, F. & Rema, P. 2015. Evaluation of IMTA-produced seaweeds (*Gracilaria*, *Porphyra*, and *Ulva*) as dietary ingredients in *Nile tilapia*, *Oreochromis niloticus* L., juveniles. Effects on growth performance and gut histology. *J. Appl. Phycol.* 27:1671–80.
- Simopoulos, A.P. & DiNicolantonio, J.J. 2016. The importance of a balanced ω -6 to ω -3 ratio in the prevention and management of obesity. Archives of Disease in childhood. *Open Heart* 2016;3:e000385.
- Simopoulos, A.P. 2002. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *J. Am. Coll. Nutr.* 21:495–505.
- Singh, S., Kate, B.N. & Banerjee, U.C. 2005. Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: an overview. *Crit. Rev. Biotechnol.* 25:73–95.
- Singleton, V.L., Orthofer, R. & Lamuela-Raventos, R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299:152–78.
- Sinha, R.P. 2013. Biomedical Applications of Mycosporine-Like Amino Acids. *Mar. Microbiol. Bioact. Compd. Biotechnol. Appl.* 509–34.
- Sinha, R.P., Klisch, M., Helbling, E.W. & Häder, D.P. 2001. Induction of mycosporine-like amino acids (MAAs) in cyanobacteria by solar ultraviolet-B radiation. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 60:129–35.
- Skerratt, J.H., Davidson, A.D., Nichols, P.D. & McMeekin, T.A. 1998. Effect of UV-B on lipid content of three Antarctic marine phytoplankton. *Phytochemistry*. 49:999–1007.
- Sliney, D.H. 2001. Photoprotection of the eye–UV radiation and sunglasses. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 64:166–75.
- Sousa, I., Gouveia, L., Batista, A.P., Raymundo, A. & Bandarra, N.M. 2008. Microalgae in novel food products. *Food Chem. Res. Dev.* 75–112.
- Souza, B.W.S., Cerqueira, M.A., Martins, J.T., Quintas, M.A.C., Ferreira, A.C.S., Teixeira, J.A. & Vicente, A.A. 2011. Antioxidant potential of two red seaweeds from the Brazilian coasts. *J. Agric. Food Chem.* 59:5589–94.

- Spicer, S.S. 1961. The use of various cationic reagents in histochemical differentiation of mucopolysaccharides. *Am. J. Clin. Pathol.* 36:393–407.
- Spicer, S.S. 1962. Basic protein visualized histochemically in mucinous secretions. *Exp. Cell Res.* 28:480–8.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. & Isambert, A. 2006. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* 101:87–96.
- Spurr, A.R. 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* 26:31–43.
- Stabili, L., Acquaviva, M.I., Biandolino, F., Cavallo, R.A., Cecere, E., Lo Noce, R., ... & Petrocelli, A. (2010). Antibacterial activity of *Gracilariopsis longissima* (Rhodophyta, Gracilariales) lipidic extract. *Rapp. Comm. int. Mer Médit*, 39.
- Stabili, L., Acquaviva, M.I., Biandolino, F., Cavallo, R.A., de Pascali, S.A., Fanizzi, F.P., Narracci, M. et al. 2012. The lipidic extract of the seaweed *Gracilariopsis longissima* (Rhodophyta, Gracilariales): A potential resource for biotechnological purposes? *N. Biotechnol.* 29:443–50.
- Stagnol, D., Renaud, M. & Davoult, D. 2013. Effects of commercial harvesting of intertidal macroalgae on ecosystem biodiversity and functioning. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 130:99–110.
- Staxen, I. & Bornman, J.F. 1994. A morphological and cytological study of *Petunia hybrida* exposed to UV-B radiation. *Physiol. Plant.* 91:735–40.
- Steentoft, M., Irvine, L.M. & Farnham, W.F. 1995. Two terete species of *Gracilaria* and *Gracilariopsis* (Gracilariales, Rhodophyta) in Britain. *Phycologia*. 34:113–27.
- Stengel, D.B. & Connan, S. 2015. Marine algae: A source of biomass for biotechnological applications. *Nat. Prod. From Mar. Algae Methods Protoc.* 1–37.
- Stengel, D.B., Connan, S. & Popper, Z. a. 2011. Algal chemodiversity and bioactivity: sources of natural variability and implications for commercial application. *Biotechnol. Adv.* 29:483–501.
- Stephanie, B., Eric, D., Sophie, F.M., Christian, B. & Yu, G. 2010. Carrageenan from *Solieria chordalis* (Gigartinales): Structural analysis and immunological activities of the low molecular weight fractions. *Carbohydr. Polym.* 81:448–60.
- Stolz, P. & Obermayer, B. 2005. Manufacturing microalgae for skin care. *Cosmet. Toilet.* 120:99–106.
- Stowe, L.G. & Osborn, A. 1980. The influence of nitrogen and phosphorus levels on the phytotoxicity of phenolic compounds. *Can. J. Bot.* 58:1149–53.
- Strasky, Z., Zemankova, L., Nemeckova, I., Rathouska, J., Wong, R.J., Muchova, L., Subhanova, I. et al. 2013. *Spirulina platensis* and phycocyanobilin activate atheroprotective heme oxygenase-1: a possible implication for atherogenesis. *Food Funct.* 4:1586–94.
- Strid, Å., Chow, W.S. & Anderson, J.M. 1994. UV-B damage and protection at the molecular level in plants. *Photosynth. Res.* 39:475–89.
- Suárez Álvarez, S., Gómez Pinchetti, J.L., Güenaga Unzetabarrenechea, L., Martel Quintana, A. & García Reina, G. 2004. Desarrollo de sistemas integrados con macroalgas de interés industrial para la biofiltración de amonio en efluentes de piscifactorías.
- Suganya, T., Varman, M., Masjuki, H.H. & Renganathan, S. 2016. Macroalgae and microalgae as a potential source for commercial applications along with biofuels production: A biorefinery approach. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 55:909–41.
- Suggett, D.J., MacIntyre, H.L. & Geider, R.J. 2004. Evaluation of biophysical and optical determinations of light absorption by photosystem II in phytoplankton. *Limnol. Oceanogr. Methods.* 2:316–32.
- Suggett, D.J., Moore, C.M. & Geider, R.J. 2010. Estimating aquatic productivity from active fluorescence measurements. In *Chlorophyll a Fluorescence in Aquatic Sciences: Methods and Applications*.

- Springer, pp. 103–27.
- Sugiharto, B., Miyata, K., Nakamoto, H., Sasakawa, H. & Sugiyama, T. 1990. Regulation of expression of carbon-assimilating enzymes by nitrogen in maize leaf. *Plant Physiol.* 92:963–9.
- Suh, S.S., Hwang, J., Park, M., Seo, H.H., Kim, H.S., Lee, J.H., Moh, S.H. et al. 2014a. Anti-Inflammation Activities of Mycosporine-Like Amino Acids (MAAs) in Response to UV Radiation Suggest Potential Anti-Skin Aging Activity. *Mar. Drugs.* 12:5174–87.
- Suh, S.S., Oh, S.K., Lee, S.G., Kim, I.C. & Kim, S. 2017. Porphyrin-334, a mycosporine-like amino acid, attenuates UV-induced apoptosis in HaCaT cells. *Acta Pharm.* 67:257–64.
- Suh, S.S., Seo, H.H., Lee, J.H., Hwang, J., Park, M., Moh, S.H. & Lee, T.K. 2014b. Anti-corrugation activity of mycosporine-like amino acid mixtures from *Chlamydomonas* sp. *J. Korea Acad. Coop. Soc.* 15:5393–9.
- Suleria, H.A.R., Gobe, G., Masci, P. & Osborne, S.A. 2016. Marine bioactive compounds and health promoting perspectives; innovation pathways for drug discovery. *Trends Food Sci. Technol.* 50:44–55.
- Sun, B., Ricardo-da-Silva, J.M. & Spranger, I. 1998. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *J. Agric. Food Chem.* 46:4267–74.
- Sunda, W., Kieber, D.J., Kiene, R.P. & Huntsman, S. 2002. An antioxidant function for DMSP and DMS in marine algae. *Nature.* 418:317–20.
- Surveswaran, S., Cai, Y.Z., Corke, H. & Sun, M. 2007. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chem.* 102:938–53.
- Sutivisedsak, N., Cheng, H.N., Willett, J.L., Lesch, W.C., Tangsrud, R.R. & Biswas, A. 2010. Microwave-assisted extraction of phenolics from bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Res. Int.* 43:516–9.
- Suzuki, K. 2000. Measurement of Mn-SOD and Cu, Zn-SOD. *Exp. Protoc. React. Oxyg. nitrogen species, Oxford Univ. Press. RU.* 91–5.
- Svensson, C.J., Pavia, H. & Toth, G.B. 2007. Do plant density, nutrient availability, and herbivore grazing interact to affect phlorotannin plasticity in the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Mar. Biol.* 151:2177–81.
- Svobodová, A., Psotová, J. & Walterová, D. 2003. Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. A review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 147:137–45.
- Tabakaeva, O. V & Tabakaev, A. V 2016. Amino Acids from Potentially Commercial Far-East Brown Algae *Costaria costata* and *Undaria pinnatifida*. *Chem. Nat. Compd.* 52:376–8.
- Taira, H. & Taguchi, S. 2017. Cellular Mycosporine-like amino acids protect photosystem II of the Dinoflagellate *Scrippsiella sweeneyae* from ultraviolet radiation damage. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 174:27–34.
- Talarico, L. & Maranzana, G. 2000. Light and adaptive responses in red macroalgae : an overview 1. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 56:1–11.
- Tannoury, M.Y., Saab, A.M., Elia, J.M., Harb, N.N., Makhoul, H.Y. & Diab-Assaf, M. 2017. In Vitro Cytotoxic Activity of *Laurencia papillosa*, Marine Red Algae from the Lebanese Coast. *J. Appl. Pharm. Sci. Vol.* 7:175–9.
- Taylor, R.B., Peek, J.T.A. & Rees, T.A. V 1998. Scaling of ammonium uptake by seaweeds to surface area: volume ratio: geographical variation and the role of uptake by passive diffusion. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 169:143–8.
- Teas, J. & Irhimeh, M.R. 2017. Melanoma and brown seaweed: an integrative hypothesis. *J. Appl. Phycol.* 29:941.
- Tengdelius, M., Kardeby, C., Fälker, K., Griffith, M., Pålsson, P., Konradsson, P. & Grenegård, M. 2017.

- Fucoidan-Mimetic Glycopolymers as Tools for Studying Molecular and Cellular Responses in Human Blood Platelets. *Macromol. Biosci.* 17.
- Ter Braak, C.J.F. & Prentice, I.C. 1988. A theory of gradient analysis. *Adv. Ecol. Res.* 18:271–317.
- Ter Braak, C.J.F. 1990. Update notes: CANOCO, version 3.10.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L. & Hawkins Byrne, D. 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J. Food Compos. Anal.* 19:669–75.
- Thiel, R.J. 2000. Natural vitamins may be superior to synthetic ones. *Med. Hypotheses.* 55:461–9.
- Thomas, N. & Kim, S.K. 2013. Beneficial effects of marine algal compounds in cosmeceuticals. *Mar. Drugs.* 11:146–64.
- Thompson, G.A. 1996. Lipids and membrane function in green algae. *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.* 1302:17–45.
- Thompson, P.A., Harrison, P.J. & Whyte, J.N.C. 1990. Influence of irradiance on the fatty acid composition of phytoplankton1. *J. Phycol.* 26:278–88.
- Timothy, R.P., Yoshiaki, M. & Carol, M.L. 1984. A manual of chemical and biological methods for seawater analysis. *Pergamon Press. Inc.* 395:475–90.
- Tiwari, B.K. & Troy, D. 2015. Seaweed Sustainability: Food and Non-Food Applications. Academic Press. 468 pp.
- Torres, A., Hochberg, M., Pergament, I., Smoum, R., Niddam, V., Dembitsky, V.M., Temina, M. et al. 2004. A new UV-B absorbing mycosporine with photo protective activity from the lichenized ascomycete *Collema cristatum*. *Eur. J. Biochem.* 271:780–4.
- Torres, P.B., Chow, F. & Santos, D.Y. 2015. Growth and photosynthetic pigments of *Gracilariopsis tenuifrons* (Rhodophyta, Gracilariaceae) under high light *in vitro* culture. *J. Appl. Phycol.* 27:1243–51.
- Torres, P.B., Chow, F., Ferreira, M.J.P. & dos Santos, D.Y.. 2016. Mycosporine-like amino acids from *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales, Rhodophyta) and its variation under high light. *J. Appl. Phycol.* 28:2035–40.
- Torzillo, G., Bernardini, P. & Masojídek, J. 1998. On-line monitoring of chlorophyll fluorescence to assess the extent of photoinhibition of photosynthesis induced by high oxygen concentration and low temperature and its effect on the productivity of outdoor cultures of *Spirulina paltensis* (cyanobacteria). *J. Phycol.* 34:504–10.
- Trick, H.N. & Pueschel, C.M. 1990. Cytochemistry of pit pulgs in *Bossiella californica* (Corallinales, Rhodophyta). *Phycologia.* 29:403–9.
- Trivedi, J., Aila, M., Bangwal, D.P., Kaul, S. & Garg, M.O. 2015. Algae based biorefinery—How to make sense? *Renew. Sustain. Energy Rev.* 47:295–307.
- Troell, M., Halling, C., Neori, A., Chopin, T., Buschmann, A.H., Kautsky, N. & Yarish, C. 2003. Integrated mariculture: asking the right questions. *Aquaculture.* 226:69–90.
- Trostchansky, A., Quijano, C., Yadav, H., Kelley, E.E. & Cassina, A.M. 2016. Interplay between Oxidative Stress and Metabolism in Signalling and Disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016.
- Tsao, R. 2010. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients.* 2:1231–46.
- Tsekos, I. 1983. The ultrastructure of carposporogenesis in *Gigartina teedii* (Roth) LAMOUR.(Gigartinales, Rhodophyceae): Gonimoblasts cells and carpospores. *Flora.* 174:191–211.
- Tuchinda, C., Srivannaboon, S. & Lim, H.W. 2006. Photoprotection by window glass, automobile glass, and sunglasses. *J. Am. Acad. Dermatol.* 54:845–54.

- Turnbull, D.J. & Parisi, A. V 2003. Spectral UV in public shade settings. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 69:13–9.
- Ukabi, S., Dubinsky, Z., Steinberger, Y. & Israel, A. 2013. Temperature and irradiance effects on growth and photosynthesis of *Caulerpa* (Chlorophyta) species from the eastern Mediterranean. *Aquat. Bot.* 104:106–10.
- Ulmann, L., Blanckaert, V., Mimouni, V., X Andersson, M., Schoefs, B. & Chenais, B. 2017. Microalgal Fatty Acids and Their Implication in Health and Disease. *Mini Rev. Med. Chem.* 17:1112–23.
- Umemura, M. & Slater, S. 2017. Reaching for global in the Japanese cosmetics industry, 1951 to 2015: the case of Shiseido. *Bus. Hist.* 1–27.
- Underwood, A.J. 1997. Experiments in ecology: their logical design and interpretation using analysis of variance. Cambridge University Press, Cambridge.
- Vadiraja, B.B., Gaikwad, N.W. & Madyastha, K.M. 1998. Hepatoprotective effect of C-Phycocyanin: protection for carbon tetrachloride and R-(+)-pulegone-mediated hepatotoxicity in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249:428–31.
- Van De Poll, W.H., Eggert, A., Buma, A.G.J. & Breeman, A.M. 2001. Effects of UV-B-induced DNA damage and photoinhibition on growth of temperate marine red macrophytes: habitat-related differences in UV-B tolerance. *J. Phycol.* 37:30–8.
- Van Meerloo, J., Kaspers, G.J.L. & Cloos, J. 2011. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Cancer cell Cult. methods Protoc.* 237–45.
- Vass, I., Szilárd, A. & Sicora, C. 2005. Adverse Effects of UV-B Light on the Structure and Function of the Photosynthetic Apparatus.
- Vergara, J.J., Bird, K.T. & Niell, F.X. 1995. Nitrogen assimilation following NH_4^+ pulses in the red alga *Gracilariopsis lemaneiformis*: effect on C metabolism. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 122:253–64.
- Vergara-Fernández, A., Vargas, G., Alarcón, N. & Velasco, A. 2008. Evaluation of marine algae as a source of biogas in a two-stage anaerobic reactor system. *Biomass and Bioenergy.* 32:338–44.
- Verhoeven, A.S., Demmig-Adams, B. & Adams III, W.W. 1997. Enhanced employment of the xanthophyll cycle and thermal energy dissipation in spinach exposed to high light and N stress. *Plant Physiol.* 113:817–24.
- Vermeer, B.J., Gilchrist, B.A. & Friedel, S.L. 1996. Cosmeceuticals: A proposal for rational definition, evaluation, and regulation. *Arch. Dermatol.* 132:337–40.
- Vermerris, W. & Nicholson, R. 2008. Isolation and identification of phenolic compounds. In *Phenolic Compound Biochemistry*. Springer, pp. 151–96.
- Viera, M.P., de Vicose, G.C., Gómez-Pinchetti, J.L., Bilbao, J., Fernandez-Palacios, H. & Izquierdo, M.S. 2011. Comparative performances of juvenile abalone (*Haliotis tuberculata coccinea* Reeve) fed enriched vs non-enriched macroalgae: Effect on growth and body composition. *Aquaculture.* 319:423–9.
- Vigani, M., Parisi, C., Rodríguez-Cerezo, E., Barbosa, M.J., Sijtsma, L., Ploeg, M. & Enzing, C. 2015. Food and feed products from micro-algae: Market opportunities and challenges for the EU. *Trends Food Sci. Technol.*
- Vílchez, C., Forján, E., Cuaresma, M., Bédmar, F., Garbayo, I. & Vega, J.M. 2011. Marine carotenoids: biological functions and commercial applications. *Mar. Drugs.* 9:319–33.
- Vimaladevi, M. 2005. Textbook of Cosmetics. CBS Publisher & Distributors.
- Vinson, J.A., Zubik, L., Bose, P., Samman, N. & Proch, J. 2005. Dried fruits: excellent *in vitro* and *in vivo* antioxidants. *J. Am. Coll. Nutr.* 24:44–50.
- Viskari, P.J. & Colyer, C.L. 2003. Rapid extraction of phycobiliproteins from cultured cyanobacteria

- samples. *Anal. Biochem.* 319:263–71.
- Viskari, P.J., Kinkade, C.S. & Colyer, C.L. 2001. Determination of phycobiliproteins by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis*. 22:2327–35.
- Vo, T.D., Nishihara, G.N., Kitamura, Y., Shimada, S., Kawaguchi, S. & Terada, R. 2015. The effect of irradiance and temperature on the photosynthesis of *Hydropuntia edulis* and *Hydropuntia eucheumatoides* (Gracilariaceae, Rhodophyta) from Vietnam. *Phycologia*. 54:24–31.
- Vosjan, J.H., Döhler, G. & Nieuwland, G. 1990. Effect of UV-B irradiance on the ATP content of microorganisms of the Weddell Sea (Antarctica). *Netherlands J. sea Res.* 25:391–3.
- Wada, N., Sakamoto, T. & Matsugo, S. 2015. Mycosporine-Like Amino Acids and Their Derivatives as Natural Antioxidants. *Antioxidants*. 4:603–46.
- Walsh, C.T. 2004. Polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: modularity and versatility. *Science*. 303:1805–10.
- Wang, B.G., Zhang, W.W., Duan, X.J. & Li, X.M. 2009. In vitro antioxidative activities of extract and semi-purified fractions of the marine red alga, *Rhodomela confervoides* (Rhodomelaceae). *Food Chem.* 113:1101–5.
- Wang, H.M.D., Chen, C.C., Huynh, P. & Chang, J.S. 2014. Exploring the potential of using algae in cosmetics. *Bioresour. Technol.* 184:355–62.
- Wang, J. & Curtis, W.R. 2015. Proton stoichiometric imbalance during algae photosynthetic growth on various nitrogen sources: toward metabolic pH control. *J. Appl. Phycol.* 43–52.
- Wang, S.Q. & Lim, H.W. 2016. Principles and practice of photoprotection. Springer.
- Wang, S.Q. & Tooley, I.R. 2011. Photoprotection in the era of nanotechnology. In *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*. Frontline Medical Communications, pp. 210–3.
- Wang, Y., Qian, F., Qian, K. & Dong, Q. 2000. Anticancer activity of phycocyanin. *J. Zhejiang Univ. (Engineering Sci.)* 35:672–5.
- Wargacki, A.J., Leonard, E., Win, M.N., Regitsky, D.D., Santos, C.N.S., Kim, P.B., Cooper, S.R. et al. 2012. An engineered microbial platform for direct biofuel production from brown macroalgae. *Science*. 335:308–13.
- Webb, A.R., DeCosta, B.R. & Holick, M.F. 1989. Sunlight regulates the cutaneous production of vitamin D3 by causing its photodegradation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 68:882–7.
- Wei, N., Quartermann, J. & Jin, Y.S. 2013. Marine macroalgae: an untapped resource for producing fuels and chemicals. *Trends Biotechnol.* 31:70–7.
- Weinberger, F., Buchholz, B., Karez, R. & Wahl, M. 2008. The invasive red alga *Gracilaria vermiculophylla* in the Baltic Sea: adaptation to brackish water may compensate for light limitation. *Aquat. Biol.* 3:251–64.
- Wellburn, A.R. 1994. The spectral determination of chlorophyll a and chlorophyll b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol.* 144:307–13.
- Wells, M.L., Potin, P., Craigie, J.S., Raven, J.A., Merchant, S.S., Helliwell, K.E., Smith, A.G. et al. 2016. Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding. *J. Appl. Phycol.* 29:1–34.
- Wells, W.W. & Xu, D.P. 1994. Dehydroascorbate reduction. *J. Bioenerg. Biomembr.* 26:369–77.
- Weykam, G., Gbmez, I., Wiencke, C., Iken, K. & Kbsen, H. 1996. Photosynthetic characteristics and C : N ratios of macroalgae from King George Island (Antarctica). *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 104:1–22.
- White, A.L. & Jahnke, L.S. 2002. Contrasting effects of UV-A and UV-B on photosynthesis and

- photoprotection of β -carotene in two *Dunaliella* spp. *Plant cell Physiol.* 43:877–84.
- Whitehead, K. & Hedges, J.I. 2005. Photodegradation and photosensitization of mycosporine-like amino acids. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 80:115–21.
- Wi, S.G., Kim, H.J., Mahadevan, S.A., Yang, D.J. & Bae, H.J. 2009. The potential value of the seaweed Ceylon moss (*Gelidium amansii*) as an alternative bioenergy resource. *Bioresour. Technol.* 100:6658–60.
- Wijesinghe, W. & Jeon, Y.J. 2011. Biological activities and potential cosmeceutical applications of bioactive components from brown seaweeds: a review. *Phytochem. Rev.* 10:431–43.
- Wilkie, A.C., Edmundson, S.J. & Duncan, J.G. 2011. Indigenous algae for local bioresource production: Phycoprospecting. *Energy Sustain. Dev.* 15:365–71.
- Wilson, M.I., Ghosh, S., Gerhardt, K.E., Holland, N., Babu, T.S., Edelman, M., Dumbroff, E.B. et al. 1995. In vivo photomodification of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase holoenzyme by Ultraviolet-B radiation (formation of a 66-Kilodalton Variant of the Large Subunit). *Plant Physiol.* 109:221–9.
- Wilt, T.J., MacDonald, R. & Ishani, A. 1999. Beta-sitosterol for the treatment of benign prostatic hyperplasia: a systematic review. *BJU Int.* 83:976–83.
- Wojdylo, A., Oszmiański, J. & Czemerys, R. 2007. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem.* 105:940–9.
- Wood, A. 1987. A simple wastewater treatment system incorporating the selective cultivation of a filamentous algae. *Water Sci. Technol.* 19:1251–4.
- Wu, G.J., Shiu, S.M., Hsieh, M.C. & Tsai, G.J. 2016. Anti-inflammatory activity of a sulfated polysaccharide from the brown alga *Sargassum cristaeifolium*. *Food Hydrocoll.* 53:16–23.
- Wu, H., Huo, Y., Zhang, J., Liu, Y., Zhao, Y. & He, P. 2015. Bioremediation efficiency of the largest scale artificial *Porphyra yezoensis* cultivation in the open sea in China. *Mar. Pollut. Bull.* 95:289–96.
- Wulf, H.C., Poulsen, T., Davies, R.E. & Urbach, F. 1989. Narrow-band UV radiation and induction of dermal elastosis and skin cancer. *Photodermatol.* 6:44–51.
- Wulff, A., Sundbäck, K., Nilsson, C. & Underwood, G.J.C. 2000. Effects of UVB radiation on a marine microphytobenthic community growing on a sand-substratum under different nutrient conditions. *Limnol. Oceanogr.* 45:1144–52.
- Xu, J. & Gao, K. 2016. Photosynthetic contribution of UV-A to carbon fixation by macroalgae. *Phycologia.* 55:318–22.
- Xu, M., Heidmarsson, S., Olafsdottir, E.S., Buonfiglio, R., Kogej, T. & Omarsdottir, S. 2016. Secondary metabolites from cetrarioid lichens: Chemotaxonomy, biological activities and pharmaceutical potential. *Phytomedicine.* 23:441–59.
- Xu, N., Fan, X., Yan, X. & Tseng, C.K. 2004. Screening marine algae from China for their antitumor activities. *J. Appl. Phycol.* 16:451–6.
- Xu, Z. & Gao, K. 2009. Impacts of UV radiation on growth and photosynthetic carbon acquisition in *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta) under phosphorus-limited and replete conditions. *Funct. Plant Biol.* 36:1057–64.
- Xue, L., Zhang, Y., Zhang, T., An, L. & Wang, X. 2005. Effects of enhanced ultraviolet-B radiation on algae and cyanobacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* 31:79–89.
- Yang, Y.I., Shin, H.C., Kim, S.H., Park, W.Y., Lee, K.T. & Choi, J.H. 2012. 6, 6'-Bieckol, isolated from marine alga *Ecklonia cava*, suppressed LPS-induced nitric oxide and PGE 2 production and inflammatory cytokine expression in macrophages: The inhibition of NF κ B. *Int. Immunopharmacol.* 12:510–7.

- Yim, J.H., Son, E., Pyo, S. & Lee, H.K. 2005. Novel sulfated polysaccharide derived from red-tide microalga *Gyrodinium impudicum* strain KG03 with immunostimulating activity *in vivo*. *Mar. Biotechnol.* 7:331–8.
- Yokoya, N.S., Kakita, H., Obika, H. & Kitamura, T. 1999. Effects of environmental factors and plant growth regulators on growth of the red alga *Gracilaria vermiculophylla* from Shikoku Island, Japan. *Hydrobiologia*. 398:339–47.
- Yoon, W.J., Ham, Y.M., Kim, K.N., Park, S.Y., Lee, N.H., Hyun, C.G. & Lee, W.J. 2009. Anti-inflammatory activity of brown alga *Dictyota dichotoma* in murine macrophage RAW 264.7 cells. *J. Med. Plants Res.* 3:1–8.
- Yoshizawa, Y., Ametani, A., Tsunehiro, J., Nomura, K., Itoh, M., Fukui, F. & Kaminogawa, S. 1995. Macrophage stimulation activity of the polysaccharide fraction from a marine alga (*Porphyra yezoensis*): structure-function relationships and improved solubility. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59:1933–7.
- Young, A.R. 2003. Are broad-spectrum sunscreens necessary for immunoprotection? *J. Invest. Dermatol.* 121:ix–x.
- Young, A.R., Claveau, J. & Rossi, A.B. 2017. Ultraviolet radiation and the skin: Photobiology and sunscreen photoprotection. *J. Am. Acad. Dermatol.* 76:S100–9.
- Young, R.M., Schoenrock, K.M., von Salm, J.L., Amsler, C.D. & Baker, B.J. 2015. Structure and Function of Macroalgal Natural Products. *Nat. Prod. From Mar. Algae Methods Protoc.* 39–73.
- Yuan, Y. V. & Athukorala, Y. 2011. 12 Red Algal Mycosporine-Like Amino Acids (MAAs) as Potential Cosmeceuticals. *Mar. Cosmeceuticals Trends Prospect.* 143.
- Yuan, Y. V. & Walsh, N. a. 2006. Antioxidant and antiproliferative activities of extracts from a variety of edible seaweeds. *Food Chem. Toxicol.* 44:1144–50.
- Yuan, Y. V., Bone, D.E. & Carrington, M.F. 2005. Antioxidant activity of dulse (*Palmaria palmata*) extract evaluated *in vitro*. *Food Chem.* 91:485–94.
- Yun, E.J., Choi, I.G. & Kim, K.H. 2015. Red macroalgae as a sustainable resource for bio-based products. *Trends Biotechnol.* 33:247–9.
- Zenker, A., Schmutz, H. & Fent, K. 2008. Simultaneous trace determination of nine organic UV-absorbing compounds (UV filters) in environmental samples. *J. Chromatogr. A.* 1202:64–74.
- Zhang, L., Li, L. & Wu, Q. 2007. Protective effects of mycosporine-like amino acids of *Synechocystis* sp. PCC 6803 and their partial characterization. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 86:240–5.
- Zhang, M., Cao, T., Ni, L., Xie, P. & Li, Z. 2010. Carbon, nitrogen and antioxidant enzyme responses of *Potamogeton crispus* to both low light and high nutrient stresses. *Environ. Exp. Bot.* 68:44–50.
- Zhang, Y., Venkitasamy, C., Pan, Z., Liu, W. & Zhao, L. 2017. Novel Umami Ingredients: Umami Peptides and Their Taste. *J. Food Sci.* 82:16–23.
- Zhang, Z., Gao, X., Yuri, T., Shingo, M. & Hiroo, O. 2004. Researches on the stability of porphyra-334 solution and its influence factors. *J. Ocean Univ. China. JOUC.* 3:166.
- Zhao, J., Fan, X., Wang, S., Li, S., Shang, S., Yang, Y., Xu, N. et al. 2004. Bromophenol Derivatives from the Red Alga *Rhodomela confervoides*. *J. Nat. Prod.* 67:1032–1035.
- Zheng, J., Hewage, S.R., Piao, M.J., Kang, K.A., Han, X., Kang, H.K., Yoo, E.S. et al. 2016. Photoprotective effect of *Carpomitra costata* extract against ultraviolet B-induced oxidative damage in human keratinocytes. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 35.
- Zubia, M., Freile-Pelegrín, Y. & Robledo, D. 2014. Photosynthesis, pigment composition and antioxidant defences in the red alga *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales, Rhodophyta) under environmental stress. *J. Appl. Phycol.* 26:2001–10.

- Zubia, M., Payri, C. & Deslandes, E. 2008. Alginate, mannitol, phenolic compounds and biological activities of two range-extending brown algae, *Sargassum mangarevense* and *Turbinaria ornata* (Phaeophyta: Fucales), from Tahiti (French Polynesia). *J. Appl. Phycol.* 20:1033–43.
- Zulueta, A., Esteve, M.J. & Frigola, A. 2009. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chem.* 114:310–6.

Lista de publicaciones

Esta Tesis Doctoral fue escrita como seis capítulos interrelacionados, de los cuales, dos ya han sido publicados en revistas internacionales que emplean el sistema de revisión por pares (**Capítulos 1 y 3**). Todo el contenido de ambos capítulos es prácticamente igual que el incorporado en el presente manuscrito, aunque es necesario destacar que incluyen algunas sutiles modificaciones y adaptaciones. Además, como producto de las colaboraciones con otros miembros del grupo, se han realizado publicaciones científicas tanto en congresos como en revistas si bien no guardan relación directa con la presente Tesis Doctoral.

Artículos científicos que avalan la Tesis Doctoral

- **Álvarez-Gómez, F.**, Korbee, N. & Figueroa, F.L. 2016. Analysis of antioxidant capacity and bioactive compounds in marine macroalgal and lichenic extracts using different solvents and evaluation methods. *Ciencias Mar.* 42:271–88. DOI: <http://dx.doi.org/10.7773/cm.v42i4.2677>
- **Álvarez-Gómez, F.**, Bouzon, Z.L., Korbee, N., Celis-Plá, P., Schmidt, É.C. & Figueroa, F.L. 2017. Combined effects of UVR and nutrients on cell ultrastructure, photosynthesis and biochemistry in *Gracilariopsis longissima* (Gracilariales, Rhodophyta). *Algal Res.* 26:190–202. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.07.022>.

Artículos científicos en colaboración

- Figueroa, F.L., Hermoso-Beltrán, M., Celis-Plá, P.S.M., Bonomi-Barufi, J., **Álvarez-Gómez, F.**, Korbee, N., López-Calderón, J. et al. 2016. Photosynthetic activity estimated as *in vivo* chlorophyll a fluorescence in calcareous red macroalgae. *Ciencias Mar.* 42. DOI: <http://dx.doi.org/10.7773/cm.v42i2.2587>.
- Figueroa, F.L., **Álvarez-Gómez, F.**, del Rosal, Y., Celis-Plá, P.S.M., González, G., Hernández, M. & Korbee, N. 2017. In situ photosynthetic yields of cave photoautotrophic biofilms using two different Pulse Amplitude Modulated fluorometers. *Algal Res.* 22:104–15. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2016.12.012>.
- Barceló-Villalobos, M., Figueroa, F.L., Korbee, N., **Álvarez-Gómez, F.** & Abreu, M.H. 2017. Production of Mycosporine-Like Amino Acids from *Gracilaria vermiculophylla*

(Rhodophyta) Cultured Through One Year in an Integrated Multi-trophic Aquaculture (IMTA) System. *Mar. Biotechnol.* 19:246–54. <https://doi.org/10.1007/s10126-017-9746-8>.

Publicaciones en libros científicos

- Figueroa, F.L., Korbee, N., Abdala-Díaz, R.T., **Álvarez-Gómez, F.**, Gómez-Pinchetti, J.L. & Acién, G. 2017. Growing algal biomass using waste. In *Bioassays in Aquatic Ecosystems: Advanced Methods and Applications*. 1st ed., p. 464. ISBN: 978-0-12-811861-0
- Navarro, N., Figueroa, F.L., Korbee, N., Bonomi-Barufi, J., **Álvarez-Gómez, F.** & De la Coba, F. 2017. Mycosporine Like-Amino Acids from red algae to develop natural UV sunscreens. Estado: en prensa para publicación.

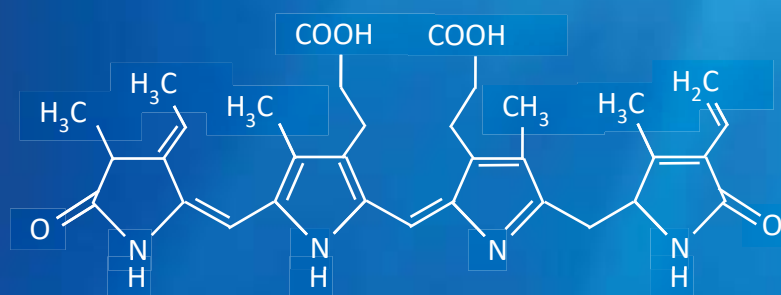
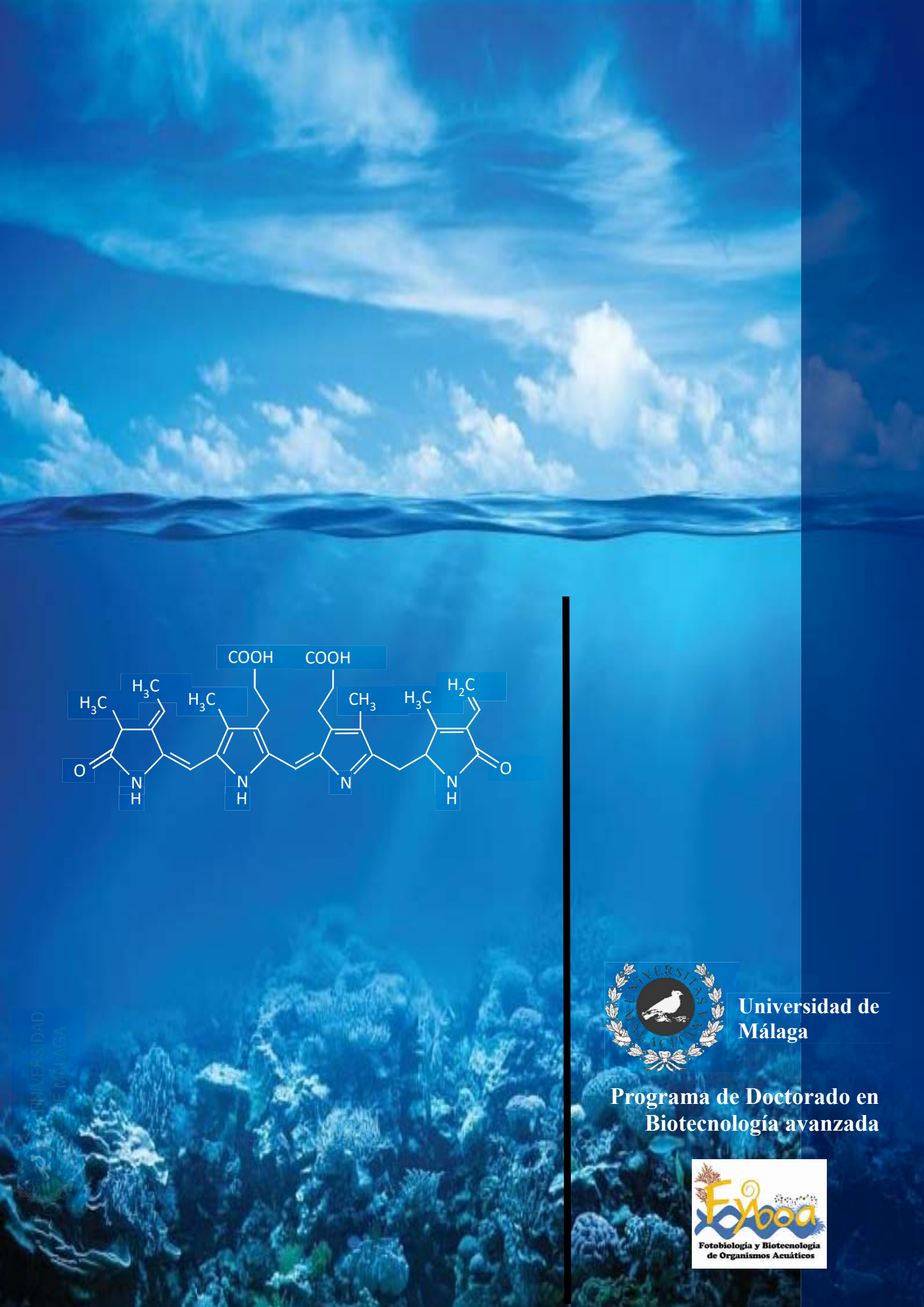
Publicaciones en congresos nacionales e internacionales

- Figueroa, F.L., Korbee, N., Celis-Plá, P., Jerez, C.G., **Álvarez-Gómez, F.**, del Rosal, Y. & Hernández-Mariné, M. 2014. Monitorización del estado fisiológico de los biofilms de la Cueva de Nerja (Málaga) mediante la fluorescencia *in vivo* de la clorofila a asociada al Fotosistema II. Cuvatur. I Congreso iberoamericano y I Congreso Español sobre Cuevas turísticas, p.487-497. ISBN: 978-84-617-1908-2.
- **Álvarez-Gómez, F.**, Schmidt, É.C., Figueroa, F.L. & Bouzon, Z.L. 2015. Interactive effects of UV radiation and ammonium on cell morphology and ultrastructure in macroalgae *Gracilariopsis longissima*. 25° Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise - CSBMM 2015. Armação dos Búzios, RJ, Brasil. p. 4-5.
- **Álvarez-Gómez, F.**, Korbee, N. & Figueroa, F.L. 2015. Interactive effects of UV radiation and ammonium on the bio-optics, photosynthesis, antioxidants and the accumulation of UV screen photoprotectors in red macroalgae. European Society for Photobiology (ESP) 16TH Congress, Aveiro, Portugal, p. 148.
- Figueroa, F.L., **Álvarez-Gómez, F.**, Celis-Plá, P., Bouzon, Z.L., Fernandes, D.R.P., Bonomi-Barufi, J., De la Coba, F. & Korbee, N. 2015. The accumulation of UV screen photoprotectors (mycosporine-like amino acids) in red macroalgae is influenced by nitrogen availability (2015). European Society for Photobiology (ESP) 16TH Congress, Aveiro, Portugal, p. 92-93.

- **Álvarez-Gómez, F.**, Korbee, N. & Figueroa, F.L. 2015. Actividad antioxidante en extractos alcohólicos e hidroalcohólicos de macroalgas marinas: aplicaciones dermocosméticas. CLABA. Congreso Latinoamericano de Biotecnología Algal. Chile, p. 182.
- **Álvarez-Gómez, F.**, González, G., Guzmán-Sepúlveda, R., Mohamed, S., Merino-Córdoba, S. & Figueroa, F.L. 2015. Utilización de distintas combinaciones espectrales e intensidades lumínicas de lámparas LEDs para el estudio de la actividad fotosintética en algas que pueden producir biodeterioro del patrimonio cultural. Congreso para el Estudio y Conservación del Patrimonio Cultural, p. 179-183. ISBN: 978-84-608-2452-7.
- Figueroa, F.L., Guzmán-Sepúlveda, R., González, G., Mohamed, S., **Álvarez-Gómez, F.**, Celis-Plá, P., del Rosal, Y., Hernández-Mariné, M. & Merino-Córdoba, S. 2015. Utilización de distintas combinaciones espectrales e intensidades lumínicas de lámparas LEDs para el estudio de la actividad fotosintética en algas que pueden producir biodeterioro del patrimonio cultural. Congreso para el Estudio y Conservación del Patrimonio Cultural, p. 174-178. 179-183. ISBN: 978-84-608-2452-7.
- **Álvarez-Gómez, F.**, del Rosal, Y., Guzmán-Sepúlveda, R., Mohamed, S., Merino-Córdoba, S., Hernández-Mariné, M., Korbee, N. & Figueroa, F.L. 2016. Selección de sistemas de iluminación LEDs en cuevas basado en los espectros de acción de la fotosíntesis: reducción del biodeterioro de espeleotemas por biofilms de algas y cianobacterias. VI Congreso español sobre Cuevas turísticas “El karst y el hombre: Las cuevas como Patrimonio de la Humanidad”. Nerja (Málaga), p. 71-79. ISBN: 978-84-617-4702-3.
- Guzmán-Sepúlveda, R., Mohamed, S., Figueroa, F.L., **Álvarez-Gómez, F.**, del Rosal, Y., Liñán-Baena, C., Merino, S., Guzmán-Navarro. & Trillo-López, M. 2016. Iluminación y adecuación de la zona peatonal de la Cueva de Nerja. VI Congreso español sobre Cuevas turísticas “El karst y el hombre: Las cuevas como Patrimonio de la Humanidad”. Nerja (Málaga). p. 81-89. ISBN: 978-84-617-4702-3.
- **Álvarez-Gómez, F.**, Figueroa, F.L., Gómez-Pinchetti, J.L. & Korbee, N. 2016. Interactive effects of solar UV radiation and ammonium on the biomass and nutritional compound production in tank cultivated *Hydropuntia cornea* (Rhodophyta). Aquaculture Europe 16. European Aquaculture Society. International Conference & Exposition September. Edinburg, Scotland. p. 331-332.
- Figueroa, F.L., Korbee, N. & **Álvarez-Gómez, F.** 2016. Actividad antioxidante en extractos alcohólicos e hidroalcohólicos de macroalgas marinas: aplicaciones dermocosméticas. XXIX

Reunión del Grupo Español de Fotobiología. Academia Española de Dermatología y Venereología. Málaga. *Actas Dermosifiliográficas*. 107. 107:225-34.

- Figueroa, F.L., Korbee, N. & **Álvarez-Gómez, F.** 2017. Efectos interactivos de la radiación UV y nitrógeno en la acumulación de fotoprotectores en macroalgas rojas. X Congreso chileno de Micro y macroalgas. Avance en biodiversidad, producción y uso de productos derivados. Organizado por Sochifico, Sociedad Chilena de Ficología. Universidad Católica del Norte, Sede Guayacán Coquimbo.



Universidad de
Málaga

Programa de Doctorado en
Biotecnología avanzada

